

Aus dem
Medizinischen Zentrum für Nervenheilkunde
Klinik für Neurologie
Direktoren: Prof. Dr. W. H. Oertel
Prof. Dr. R. C. Dodel
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Charakterisierung des striatalen 6-OHDA-Tiermodells
des Morbus Parkinson an der Maus



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Corinna Strenzke
aus Gronau/Leine

Marburg, 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 04.11.2010

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: PD Dr. Andreas Hartmann

1. Koreferent(en): Prof. Dr. H.-J. Braune

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	4
1.1. Das idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS)	4
1.1.2. Funktionelle Anatomie	6
1.1.2.1. Dopamin	7
1.1.3. Physiologie und Pathophysiologie des IPS	9
1.1.4. Ätiopathogenese des IPS	12
1.1.4.1. Oxidativer Stress	13
1.1.4.2. Exitotoxizität	17
1.1.4.3. Inflammatorische Prozesse und Apoptose	17
1.1.4.4. Ubiquitin-Proteasomen-Dysfunktion	18
1.1.5. Therapie des Morbus Parkinson	18
1.2. Tiermodelle des Morbus Parkinson	19
1.2.1. Das 6-OHDA-Modell	19
1.2.1.1. Das akute 6-OHDA-Modell	20
1.2.1.2. Das subakute 6-OHDA-Modell	21
1.2.1.3. Wirkmechanismus von 6-OHDA	22
1.2.2. Das MPTP-Modell	24
1.3. Ziele der Arbeit	25
2. MATERIAL UND METHODEN	26
2.1. Tiere und Tierhaltung	26
2.2. Eingesetzte Substanzen und Chemikalien	26
2.2.1. Operation und stereotaktische Läsion	26
2.2.2. Probenaufbereitung für die HPLC und Durchführung	27
2.2.3. Anfertigung der Gehirnschnitte	27
2.2.4. Immunhistochemie	28
2.2.5. Verwendete Lösungen und deren Herstellung	28
2.3. Verwendete Geräte	29
2.3.1. Stereotaktische Läsion	29
2.3.2. HPLC	29
2.3.2.1. Herstellung der Homogenisate	29
2.3.2.2. Bestimmung von DA, HVA und 2,5-DHBA	30
2.3.2.3. Bestimmung von Salicylat	30
2.3.3. Herstellung der Gehirnschnitte	31
2.3.4. Mikroskopische Analyse	31

2.3.5. Verhaltenstestung.....	31
2.4. Stereotaktische Läsionen	31
2.5. Gewebeentnahme und -aufarbeitung	33
2.5.1. Gewebeentnahme und -aufarbeitung für die HPLC-Bestimmung.....	33
2.5.2. Gewebeentnahme und -aufarbeitung für histologische Untersuchung ..	33
2.6. Elektrochemische Auswertung mittels HPLC	34
2.6.1. Bestimmung von Neurotransmittern und ihren Metaboliten sowie Hydroxylradikalen mittels elektrochemischer Detektion.....	34
2.6.2. Bestimmung von Natriumsalicylat mittels UV-Detektion.....	35
2.7. Immunhistochemie und histologische Untersuchung	35
2.7.1. Anfertigen von Gehirnschnitten.....	35
2.7.2. TH-Immunreaktivität	36
2.7.3. Mikroskopische Analyse	37
2.8. Verhaltenstestung	39
2.9. Statistik	40
 3. ERGEBNISSE	 41
3.1. Neurochemische Untersuchung	41
3.1.1. Effekte der 6-OHDA-Läsion auf Gewebekonzentrationen von Dopamin in Striatum und Substantia nigra	41
3.1.2. Effekte der 6-OHDA-Läsion auf Dopaminumsatz in Striatum und Substantia nigra	43
3.1.3. Effekte der 6-OHDA-Läsion auf Gewebekonzentration von 5- Hydroxyindolessigsäure in Striatum und Substantia nigra	44
3.1.4. 6-OHDA-induzierte Hydroxylierungsreaktionen in Striatum und Substantia nigra	45
3.2. Histologie	47
3.2.1. Effekte der Läsion auf die Anzahl TH-positiver Neurone in Substantia nigra und VTA	47
3.3. Verhaltenstestung	50
3.3.1. 6-OHDA induzierte motorische Defizite bei konstanter Rod- Geschwindigkeit.....	50
3.3.2. 6-OHDA induzierte motorische Defizite bei beschleunigter Rod- Geschwindigkeit.....	51
 4. DISKUSSION	 53
4.1. Diskussion der Methoden	54

4.1.1 Diskussion methodischer Aspekte des Modells	54
4.1.2. Diskussion analytischer Aspekte des Modells.....	55
4.2 Diskussion der Ergebnisse.....	58
4.2.1 Dosierung von 6-OHDA	58
4.2.2 Abhängigkeit der Toxizität vom genetischen Hintergrund	59
4.2.3 Zeitverlauf des nigrostriatalen Schadens	60
4.2.3.1 Zeitverlauf der Neurotransmitterkonzentration.....	60
4.3.2.2 Zeitverlauf des nigralen Zellverlusts	62
4.2.4 Zeitverlauf der Radikalentstehung	65
4.2.3. Verhaltensanalyse	66
 5. ZUSAMMENFASSUNG	70
 ANHANG.....	72
Abkürzungsverzeichnis	72
Literaturverzeichnis	74
Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Verzeichnis der akademischen Lehrer	93
Danksagung	95
Ehrenwörtliche Erklärung	96

1. Einleitung

1.1. Das idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS)

Das idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS, Morbus Parkinson, primäres Parkinson-Syndrom) ist eine chronisch progrediente, degenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems mit Störung der willkürlichen und unwillkürlichen Motorik bislang unbekannter Ursache.

Kardinalsymptome der Erkrankung sind Akinese (Verlangsamung bei der Initiierung und Durchführung willkürlicher Bewegungen, progressive Verlangsamung), Rigor (generalisierter erhöhter Muskeltonus), Ruhetremor und posturale Instabilität. Hinzu kommen fakultative Begleitsymptome wie sensorische Symptome (Dysästhesien und Schmerzen), vegetative Symptome (Störungen von Blutdruck, Temperaturregulation, Harnblasenfunktion und sexueller Funktion), psychische Symptome (v.a. Depression) und kognitive Symptome (frontale Störungen, im fortgeschrittenen Stadium Demenz).

Diese typische Symptomkonstellation wurde 1817 von dem Londoner Arzt James Parkinson als Krankheitsentität erfasst und in seiner Monographie „An Essay on the shaking palsy“ charakterisiert (Parkinson, 1817). Etwa 50 Jahre später erhielt der Morbus Parkinson seinen Namen - benannt nach dem Erstbeschreiber - durch Jean Marie Charcot.

Der Morbus Parkinson ist mit einer Prävalenz von 100-200/100.000 Einwohner die zweithäufigste chronisch neurodegenerative Erkrankung nach dem Morbus Alzheimer und die häufigste neurologische Erkrankung der Basalganglien (Cummings, 1999). Bei den über 65-Jährigen beträgt die Prävalenz 1800/100.000 Einwohner (Dodel et al., 1997). Beide Geschlechter sind nahezu gleich häufig betroffen mit geringer Dominanz des männlichen Geschlechtes (de Rijk et al., 2000).

Aufgrund des chronisch-progredienten Verlaufes des IPS resultieren derzeit jährliche Kosten für Medikation, Pflege und stationäre Aufenthalte pro Patient von durchschnittlich 7.000 Euro/Jahr (Dodel et al., 1997).

Die Ätiopathologie der Erkrankung ist bis heute ungeklärt.

Verantwortlich für die Parkinson-typischen Symptome ist die Degeneration bestimmter Kerngebiete, insbesondere der Substantia nigra pars compacta (SNpc) mit ihren dopaminergen Neuronen, dem ein konsekutiver striataler Dopaminmangel folgt (Ehringer und Hornykiewicz, 1960; Agid 1991; Fahn und Przedborski 2000). Die klinische Manifestation zeigt sich bei einem Zellverlust von ca. 50% bei einer Reduktion der striatalen Dopaminkonzentration von 70-80%. Es wird von einer langen präsymptomatischen Phase von ca. 5 Jahren ausgegangen (Fearnley und Lees, 1991).

Abzugrenzen sind symptomatische und sekundäre Parkinson-Syndrome bekannter Ursache. Hierbei kann eine vaskuläre (z.B. subkortikale vaskuläre Enzephalopathie), medikamentöse (z.B. durch klassische Neuroleptika, Lithium, Kalzium-Antagonisten), toxische (z.B. Kohlenmonoxid, Mangan), metabolische (z.B. Morbus Wilson) oder eine entzündliche Ursache (z.B. AIDS-Enzephalopathie) zugrunde liegen.

Weiterhin müssen Parkinson-Syndrome im Rahmen anderer neurodegenerativer Erkrankungen, sog. atypische Parkinson-Syndrome, differentialdiagnostisch ausgeschlossen werden wie z.B. die Multisystematrophie (MSA), die progressive supranukleäre Blickparese (PSP), die kortikobasale Degeneration (CBG), spinocerebelläre Atrophien oder die Demenz vom Lewy-Körper-Typ (BLBD) (Berlit, Klinische Neurologie, 2006).

Das IPS macht mit ca. 75% den größten Anteil aller Parkinson-Syndrome aus (Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Neurologie, Parkinson-Syndrome: Diagnostik und Therapie, Stand 2009, www.dgn.org).

Die Diagnosestellung eines IPS erfolgt bei Vorliegen motorischer Auffälligkeiten (Akinese/Bradykinese) nach Ausschluss häufiger Differentialdiagnosen und eines der folgenden, in unterschiedlicher Gewichtung auftretenden Kardinalsymptome: Rigor, Ruhetremor und posturale Instabilität. Unterstützende Kriterien sind ein einseitiger Beginn der Erkrankung und/oder eine persistierende Asymmetrie im Krankheitsverlauf bestehen bleibt sowie ein eindeutig positives Ansprechen auf Gabe von L-DOPA. (Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Neurologie, Parkinson-Syndrome: Diagnostik und Therapie, Stand 2009, www.dgn.org).

Bis heute gibt es keinen eindeutigen biologischen Marker zur Erkennung eines IPS. Etwa 90% der klinisch diagnostizierten idiopathischen Parkinson-Syndromen können histopathologisch bestätigt werden (Hughes et al., 2002).

1.1.2. Funktionelle Anatomie

Die Basalganglien sind ein funktionell zusammengehörender Teil des motorischen Systems mit den Hauptkerngebieten Nucleus caudatus, Putamen (als Striatum zusammengefasst) und Globus pallidus (bestehend aus Pars externa (GPe) und Pars interna (GPi)) im subkortikalen Marklager des Telencephalons. Sie sind beteiligt an Bewegungsinitiation, Bewegungsmodulation und Regulierung des Muskeltonus. Wichtigste Aufgabe der Basalganglien ist Steuerung von Ausmaß, Richtung, Kraft und Geschwindigkeit einer Bewegung.

In enger funktioneller Beziehung zu den Basalganglien stehen Kerngebiete des Mesencephalons: Substantia nigra (bestehend aus pars compacta und pars reticularis) und Nucleus ruber; sowie der Nucleus

subthalamicus (NST) als Kerngebiet des Diencephalons (Duus, Neurologisch-topische Diagnostik, 2003).

Reguliert wird die Aktivität der Basalganglien über Neurotransmitter. Dabei spielen sowohl inhibitorische Neurotransmitter wie GABA, Enkephalin oder Substanz P als auch exzitatorische Transmitter wie Glutamat und Dopamin eine wichtige Rolle.

1.1.2.1. Dopamin

Der vorherrschende Neurotransmitter im Bereich des nigrostriatalen Systems ist das Dopamin.

Dopamin gehört biochemisch zu den Katecholaminen und wird aus der Aminosäure Tyrosin synthetisiert. Mittels Tyrosinhydroxylase (TH) wird aus Tyrosin Dopa (3,4-Dihydroxyphenylalanin) synthetisiert und anschließend durch die Dopa-Decarboxylase zu Dopamin umgewandelt.

Die Umsetzung durch die TH ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Dopaminsynthese.

Das entstandene Dopamin wird über den vesikulären Monoamintransporter (VMAT-2) in die Speichervesikel der Nervenendigungen aufgenommen. Bei Eintreffen eines adäquaten Nervenimpulses wird Dopamin in den synaptischen Spalt freigesetzt, von wo aus es zu den Dopaminrezeptoren diffundiert.

Dopaminrezeptoren werden in D₁ (D₁ und D₅, exzitatorisch) - und D₂ (D₂, D₃ und D₄, inhibitorisch)-Rezeptoren klassifiziert.

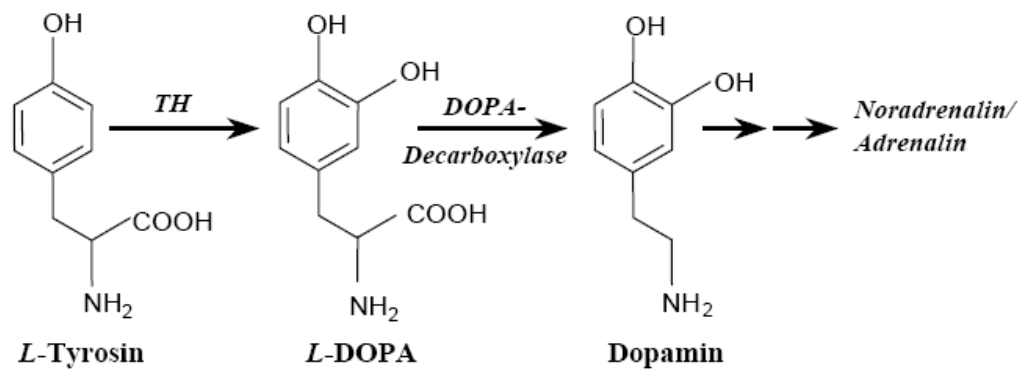


Abb.1.1.: Synthese des Dopamins

Die Inaktivierung von Dopamin erfolgt zum größten Teil durch eine Wiederaufnahme durch den Dopamin-Transporter (DAT) in die präsynaptische Nervenendigung.

Am Abbau von Dopamin sind hauptsächlich zwei Enzyme, Monoaminoxidase (MAO)-B und Catechol-O-methyltransferase (COMT) beteiligt. Die MAO liegt im menschlichen Körper in zwei Isoformen vor. Die für den Abbau relevante Form ist dabei die MAO-B.

Die COMT baut Dopamin zu 3-Methoxytyramin (MT) ab. MT wird anschließend durch die MAO zu Homovanillinmandelsäure (HVA) umgewandelt, welche mit dem Urin ausgeschieden wird.

Ein anderer Weg ist der Abbau zuerst durch die MAO zu 3,4-Dihydrophenylelessigsäure (DOPAC) und anschließend durch die COMT zu HVA.

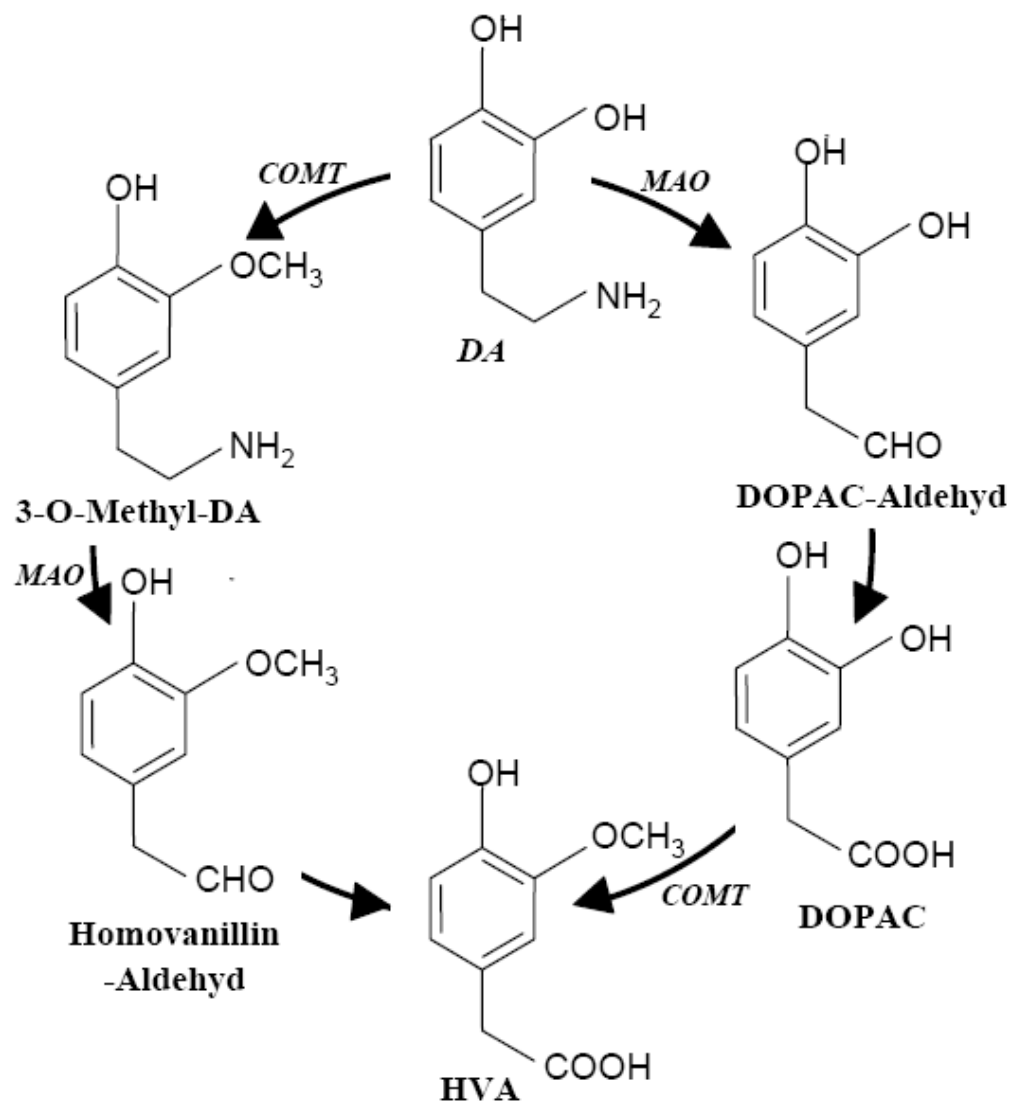


Abb.1.2.: Dopaminmetabolismus

1.1.3. Physiologie und Pathophysiologie des IPS

Bei der normalen Kontrolle der Motorik kann man zwei verschiedene striato-thalamische Wege unterscheiden: ein direktes und ein indirektes Projektionssystem. Wichtigste Struktur hierbei ist das Striatum, das sowohl exzitatorische glutamaterge Afferenzen aus dem Neocortex als auch dopaminerge Afferenzen aus der SNpc erhält.

Direkte Projektionsbahn:

Die direkte Projektionsbahn ist GABAerg und verbindet Striatum und internes Pallidumsegment (GPi). Über die D1-vermittelte Aktivierung der Neurone durch dopaminerge Fasern der SNpc wirken die GABAergen striatalen Fasern hemmend auf GPi, welches somit seinen hemmenden Einfluss auf Thalamus und Hirnstamm verliert. Infolge dessen kann über die glutamaterge thalamo-cortikale Projektion eine Aktivierung des Kortex erfolgen (Kandel et al., 2000, Lang und Lozano, 1998)(vgl. Abb 1.3).

Indirekte Projektionsbahn:

Die indirekte Projektionsbahn verbindet das Striatum über zwei aufeinander folgende inhibitorische Neurone mit dem Globus pallidus externus (GPe) und dem Nucleus subthalamicus (NST). Über die D2-vermittelte Hemmung der Neurone durch dopaminerge Fasern der SNpc verliert das Striatum seinen hemmenden Einfluss auf den GPe, der somit die Aktivität des NST herabsetzt.

Die Hemmung des NST unterdrückt die glutamaterge Innervation von GPi und SNpr, sodass auch hier die glutamaterge thalamo-cortikale Projektion zur Aktivierung des Kortex führt (Kandel et al., 2000, Lang und Lozano, 1998)(vgl. Abb 1.3).

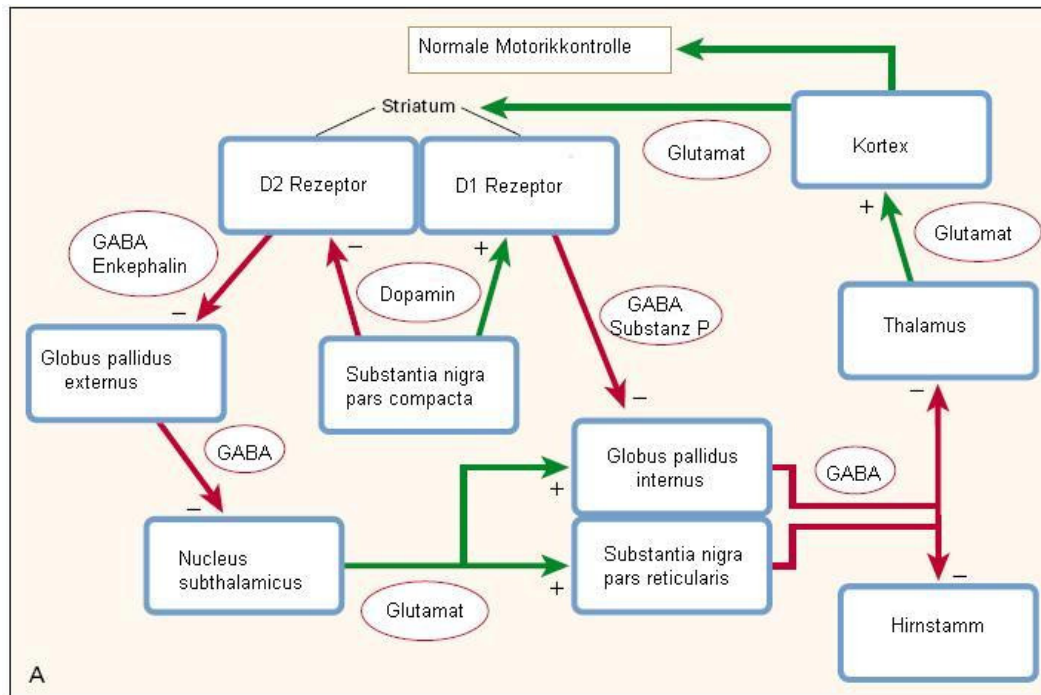


Abb. 1.3.: Verschaltung der Basalganglien nach Lang und Lozano, 1998.

Der Dopaminmangel im Striatum von Patienten mit IPS, der aus dem Untergang dopaminerger Neurone in der SNpc resultiert, führt zu einer Überaktivität des indirekten Weges aufgrund fehlender Hemmung des GPe. Dadurch erfolgt eine Enthemmung des NST, welche wiederum zu einer Enthemmung des GPi und der SNpr führt. Gleichzeitig fehlt die Aktivierung des direkten Weges durch fehlende Aktivierung der D1-Rezeptoren. Daraus resultiert ein GABAerges Transmitterübergewicht, welches Thalamus und Hirnstamm hemmt. Der Thalamushemmung folgt eine verminderte Kortexaktivierung und damit als klinische Symptome Akinese, Rigor und Tremor. Die Hemmung des Hirnstamms könnte die Gang- und Haltungsinstabilitäten erklären (Lang und Lozano, 1998) (vgl. Abb 1.4).

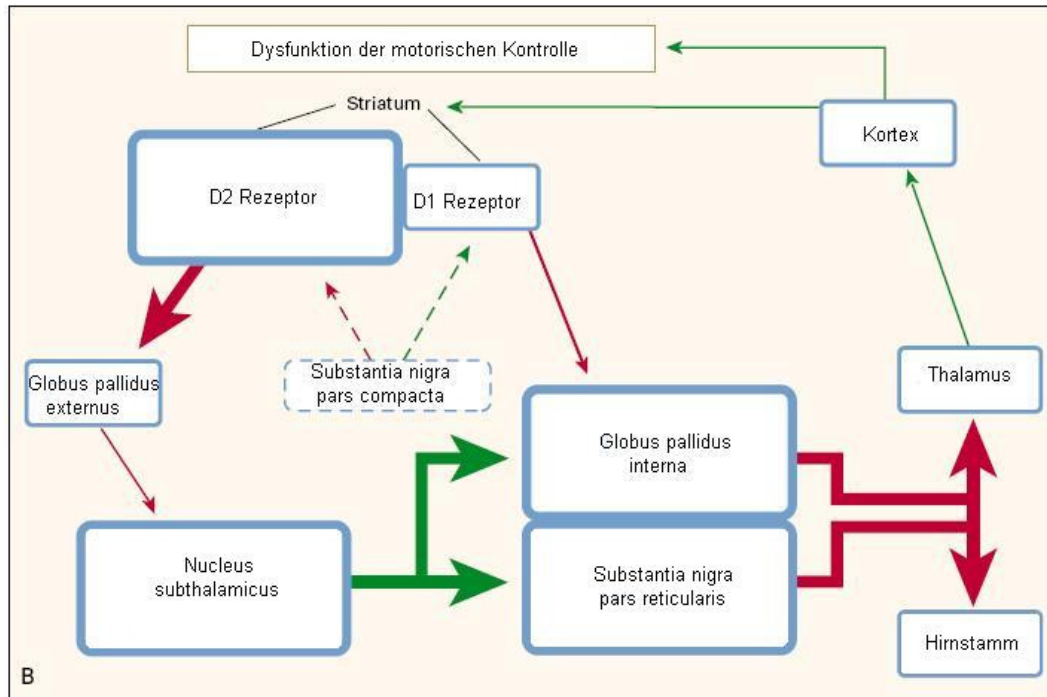


Abb.1.4.: Verschaltung beim IPS nach Lang und Lozano, 1998

Neurohistopathologische Merkmale der degenerierten Neurone von Parkinson-Patienten sind im Cytoplasma auftretende 5 - 25 µm große, kugelförmige Einschlüsse mit dichtem, eosinophilem Kern und blassem Hof - die so genannten "Lewy-Körperchen" (Goedert et al., 1998). Sie wurden erstmals 1912 beschrieben und später nach ihrem Entdecker Lewy benannt. Neben Ubiquitin und Neurofilament-Proteinen gehört das Protein α -Synuclein zu den Hauptbestandteilen der Lewy-Körperchen (Giasson et al., 2000).

1.1.4. Ätiopathogenese des IPS

Die spezifische Ätiologie des IPS ist noch unklar.

Lange wurde die Rolle von Umweltfaktoren bei der Entstehung des IPS diskutiert, besonders nach gehäuften Fällen von IPS nach Exposition mit beispielsweise Herbiziden oder verunreinigtem Wasser (Tanner und Langston, 1990). Es konnte jedoch bis heute kein spezifisches Toxin in den Gehirnen von Parkinson-Patienten festgestellt werden (Olanow und

Tatton, 1999). Es häufen sich jedoch epidemiologische Studien, die einen Zusammenhang zwischen Parkinson-Syndromen und dem professionellen Einsatz von Pestiziden nahe legen. So konnten Elbaz et al. eine dosisabhängige Relation zwischen Parkinson-Syndromen und Herbiziden und Fungiziden herstellen. Dabei fiel eine besondere Häufung bei Organochloriden wie Lindan und Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) auf (Elbaz et al., 2009).

Bei einem geringen Teil der Patienten wird ein monogener Erbgang als Ursache der Parkinson-Erkrankung angenommen. Derzeit sind 14 Gendefekte bekannt (PARK 1-13, sowie Na) (Moore et al., 2005), wie beispielsweise eine Punktmutation des PARK 1 Gens, welches für α -Synuclein kodiert (Gasser et al., 2005 und 2007).

Aktuell muss davon ausgegangen werden, dass nicht ein einzelner Faktor ursächlich für das IPS ist, sondern eher eine Kombination aus endogenen und exogenen Toxinen auf der Grundlage einer genetischen Disposition (Olanow und Tatton, 1999, Sulzer et al., 2007).

1.1.4.1. Oxidativer Stress

Die Ursache für die Degeneration dopaminerger Neurone in der Substantia nigra ist bislang trotz einer Vielzahl von Studien noch ungeklärt.

Eine wichtige Rolle in der Pathogenese des IPS scheint die Entstehung von oxidativem Stress zu spielen (Adams et al., 1991; Fahn et al., 1992), wobei nach wie vor nicht geklärt ist, ob oxidativer Stress ein primäres oder sekundäres Phänomen darstellt. (Anderson et al., 2004).

Oxidativer Stress entsteht aus einem Ungleichgewicht zwischen der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und reaktiven Stickstoffverbindungen (RNS) und/oder einer verminderten Funktion antioxidativer Mechanismen.

Zu den reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gehören Sauerstoffradikale, die ein ungepaartes Elektron auf der äußeren Schale besitzen und somit sehr instabile Verbindungen darstellen wie das Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$) oder das

Hydroxylradikal (OH^\cdot), aber auch nicht-radikalische Verbindungen wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) sind hierzu zu zählen.

Besonders das Hydroxylradikal ist hochreaktiv und dadurch in der Lage schädlich zu wirken und Lipide (Dexter et al., 1989), Proteine (Alam et al., 1997) und DNA oxidativ (Alam et al., 1997) zu verändern.

Zu den wichtigsten Vertretern der reaktiven Stickstoffspezies (RNS) zählen das Stickstoffmonoxidradikal (NO^\cdot) und Peroxynitrit (ONOO^\cdot).

Besonders Peroxynitrit ist in der Lage Proteine zu nitrieren und dadurch Enzyme funktionsunfähig zu machen (Greenacre und Ischiropoulos, 2001), kann aber ebenfalls DNA, Lipide (Radi et al., 1991) und Antioxidantien oxidativ schädigen.

Die Hauptquelle für die Produktion freier Radikale stellt der zelluläre Metabolismus dar. Schon der physiologische Dopaminmetabolismus im gesunden Gehirn führt zur Freisetzung oxidativ wirkender Moleküle (Ben Sachar et al., 1995).

Dopamin wird enzymatisch durch die Monoaminoxidase (MAO)-B zu DOPAC (3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure) abgebaut, wobei H_2O_2 als Nebenprodukt entsteht (Maker et al., 1981).

Dopamin kann aber auch in Anwesenheit von Sauerstoff autooxidativ umgesetzt werden, wobei Semichinonradikale (SQ^\cdot), H_2O_2 und O_2^\cdot entstehen.

Das so entstandene H_2O_2 wird über die Fenton-Reaktion zu freien Radikalen umgesetzt. Bei dieser reagiert Fe^{2+} mit H_2O_2 zu OH^\cdot .

Eisenakkumulation in dopaminergen Neuronen und Gliazellen der SN scheint in der Entstehung von oxidativem Stress, Proteinansammlungen und neuronalem Zelltod eine Rolle zu spielen (Hirsch et al., 2009)

Es konnten erhöhte Eisenspiegel in den betroffenen Hirnstrukturen nachgewiesen werden. Dieser erhöhte Eisengehalt resultiert aus einer verstärkten Penetration von Eisen ins Gehirnparenchym aufgrund erhöhter Spiegel von Laktoferrin und Laktoferrinrezeptoren in den dopaminergen Neuronen der SN (Hirsch et al., 2006).

Auch wenn es weiter Gegenstand der Forschung ist, ob Eisenakkumulation direkt in die Pathogenese involviert ist oder lediglich eine Rolle in der Krankheitsprogression spielt, besteht kein Zweifel an der Beteiligung von eisen-induziertem oxidativem Stress an der Neurodegeneration (Foley und Riederer, 2000; Berg und Hochstrasser, 2006).

ROS-Entstehung

- A.** $DA + O_2 + H_2O_2 \rightarrow DOPAC + H_2O_2$
(enzymatische DA-Autooxidation durch MAO-B)
- B.** $DA + O_2 \rightarrow SQ\cdot + O_2^{\cdot-} + H^+$
 $DA + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow SQ\cdot + H_2O_2$
(DA-Autooxidation)
- C.** $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow \cdot OH + OH^- + Fe^{3+}$
(Fenton-Reaktion)
- D.** $O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^- + \cdot OH$
(Haber-Weiss-Reaktion)

Für die neurotoxischen Stoffwechselprodukte steht eine Vielzahl körpereigener Abwehrsysteme zu Verfügung. Dazu gehört vor allem die Superoxiddismutase (SOD) sowie die Glutathionperoxidase und die Katalase. Ein weiteres Abwehrsystem setzt sich aus Glutathion (GSH), Vitamin E und C zusammen.

Die erniedrigte Konzentration von GSH in der SN von Parkinson-Patienten (Sian et al., 1994) sowie die erhöhte Aktivität der SOD (Ceballos et al., 1990) sind ein weiteres Indiz für die Beteiligung von oxidativem Stress an der Pathogenese.

Eine weitere Quelle bei der Produktion freier Radikale stellt die mitochondriale Dysfunktion dar. Es konnte eine selektive Aktivitätsabnahme um 30 – 40% des Komplex I der mitochondrialen

Atmungskette in der SNpc von Parkinson-Patienten nachgewiesen werden (Schapira et al., 1990).

Auch entstandenes Peroxynitrit kann die Komplexe I, II und III der Atmungskette irreversibel hemmen (Radi et al., 1991). Diese Funktionsstörung der Atmungskette führt wiederum zur Entstehung freier Radikale.

Aufgrund ihrer hohen Reaktivität können freie Radikale nicht direkt gemessen werden (Berg et al., 2004).

Eine verlässliche Methode zur indirekten Messung der entstandenen Hydroxylradikale basiert auf der Fähigkeit des OH^\bullet mit aromatischen Molekülen zu reagieren (Coudray et al., 1995). Die Messung der Hydroxylierungsprodukte der Salicylsäure 2,3-DHBA (Dihydrobenzoesäure) und 2,5-DHBA stellt eine verlässliche quantitative Methode dar (Knauer und Halliwell, 1994).

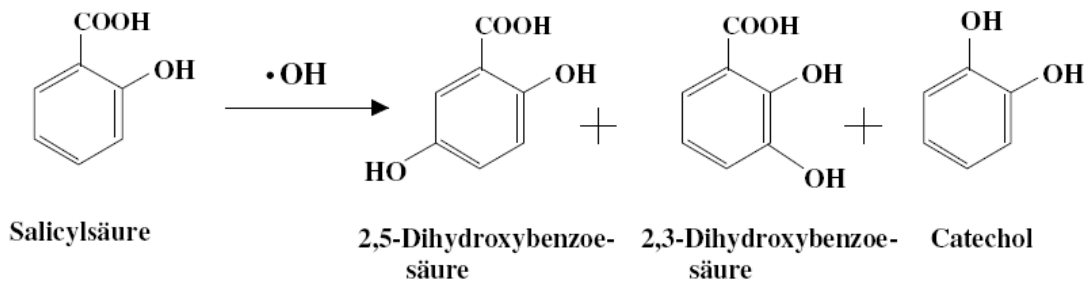


Abb. 1.5.: Reaktion des Hydroxylradikals mit Salicylsäure

Eine weitere Möglichkeit ist die Messung der Hydroxylierungsprodukte des D-Phenylalanins: para-, meta- und ortho-Tyrosin (Ferber et al., 2001).

Als Marker für eine erhöhte Rate an Lipidoxidation konnte man bei Parkinson-Patienten erhöhte Spiegel von Malondialdehyd nachweisen (Dexter et al., 1994).

Oxidative Veränderungen von DNA-Basen können als erhöhte Spiegel von 8-Hydroxy-2-desoxyguanosin nachgewiesen werden (Yoritaka et al., 1996).

Für die Beteiligung von Peroxynitrit ist 3-Nitrotyrosin, Produkt aus der Reaktion von Peroxynitrit mit Proteinen, ein guter Marker (Greenacre und Ischiropoulos, 2001).

1.1.4.2. Exitotoxizität

Eine weitere mögliche Quelle für die gesteigerte Produktion von freien Radikalen könnte eine Überaktivierung von Glutamatrezeptoren sein.

Die dopaminergen Neurone der SN sind reich an glutamatergen NMDA-Rezeptoren und erhalten den Großteil ihrer Afferenzen vom Kortex und dem Nucleus subthalamicus (NST).

Bei einer Überaktivität des NST kommt es zu einer Erhöhung der Glutamatausschüttung und einer Aktivierung von NMDA-Rezeptoren. Folge ist ein schneller Calciumeinstrom in die Zelle. Der Anstieg intrazellulären Calciums führt zu einer Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen Stickstoffmonooxidsynthase (NOS), die wiederum zu einer vermehrten Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) führt. NO kann mit Superoxidanionen reagieren, wodurch Peroxynitrit und Hydroxylradikale entstehen, jeweils mit starken oxidativen Eigenschaften (Beckmann et al., 1996). Neben der Bildung von RNS kann Peroxynitrit außerdem die Komplexe I, II und III der Atmungskette hemmen, wodurch wiederum oxidativer Stress entsteht.

Diese Theorie des hyperaktiven NST wird von Untersuchungen gestützt, die zeigen, dass Läsionen des NST vor 6-OHDA-Toxizität schützen (Piallat et al., 1996, Wallace et al., 2007).

1.1.4.3. Inflammatorische Prozesse und Apoptose

Eine große Zahl reaktiver (HLA-DR) positiver Mikroglia konnte in der SN von Patienten mit IPS festgestellt werden (McGeer et al., 1988). Diese und die Beobachtung, dass in der SNpc von Parkinson-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen erhöhte Spiegel an Interleukin- 1β , γ -Interferon und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α gefunden wurden (Hirsch et al., 1998), legt den Verdacht nahe, dass immunologische bzw.

inflammatorische Prozesse an der Pathogenese des IPS beteiligt sind (Hirsch und Hunot, 2009).

TNF- α kann ebenso wie freie Sauerstoffradikale eine Signalkaskade aktivieren, die Apoptose einleitet. Die Aktivierung von TNF- α -Rezeptoren assoziiert mit einem Anstieg von NF- κ -B, einem Transkriptionsfaktor, der als zentraler Mediator der Immunantwort bezeichnet wird, und die Entwicklung von apoptotischen Zelltod konnte von Hunot et al. (1997) an Primärkulturen von mesencephalen Rattenzellen und in vivo gezeigt werden.

1.1.4.4. Ubiquitin-Proteasomen-Dysfunktion

Das Ubiquitin-Proteasomen-System (UPS) neutralisiert zelluläre Proteine, die von ihrer ursprünglichen Struktur abweichen (Giasson und Lee, 2003). Dabei werden die fehlerhaften Proteine ubiquitiniert und durch Proteasomen abgebaut.

Die Entdeckung, dass Gendefekte bei Fällen von familiärem Parkinson-Syndrom zur Bildung abnormaler Proteine wie α -Synuclein oder zur Beeinträchtigung des UPS führen, legt die Vermutung nahe, dass die Akkumulation von missgebildeten Proteinen oder/und eine Ubiquitin-Proteasomen-Dysfunktion eine wesentliche Rolle in der Pathogenese des IPS spielt (McNaught et al., 2003).

1.1.5. Therapie des Morbus Parkinson

L-Dopa war die erste Substanz, die zum Ausgleich des dopaminergen Defizits eingesetzt wurde und stellt auch noch heute die effektivste Behandlungsmethode dar (Lang und Lozano, 1998). Problematisch sind dabei die Langzeitwirkungen unter der Therapie mit L-Dopa wie Wirkungsfluktuationen im Tagesverlauf und Dyskinesien.

Eine weitere Wirkstoffklasse stellen die Dopaminagonisten dar, die pharmakologisch in Ergotaminderivate bzw. „non-ergots“ unterteilt werden

und unterschiedliche Affinitäten zu den verschiedenen Dopaminrezeptorsubtypen besitzen.

Zum Einsatz in der Therapie des IPS kommen zudem MAO-B-Hemmer, COMT-Hemmer sowie in untergeordneter Rolle Anticholinergika.

Operative Verfahren gewinnen zunehmend an Bedeutung in der Therapie des IPS. Mit der tiefen Hirnstimulation gibt es eine potente Behandlungsmethode im fortgeschrittenen Stadium des IPS.

Dabei kommt als Stimulationsort in erster Linie der NST sowie Globus pallidus internus und Nucleus ventralis intermedius des Thalamus in Frage (Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Neurologie, Parkinson-Syndrome: Diagnostik und Therapie, Stand 2009, www.dgn.org).

1.2. Tiermodelle des Morbus Parkinson

Tiermodelle sind notwendig, um die pathogenetischen Mechanismen und mögliche therapeutische Strategien menschlicher Erkrankungen zu studieren.

Ein Anspruch an ein ideales Parkinson-Tiermodell wäre, dass zum Zeitpunkt der Geburt die Anzahl dopaminerger Neurone in der SN normal ist und erst im Erwachsenenalter progressiv um mindestens 50 % abnimmt. Zudem sollten motorische Defizite erkennbar sein, v.a. Bradykinesie, Rigor und Ruhetremor. Histopathologisch sollten Lewy-Körperchen nachweisbar sein (Beal, 2001). Leider erfüllt kein Tiermodell bislang all diese Kriterien.

Die am häufigsten verwendeten Tiermodelle in der Parkinsonforschung sind das 6-OHDA- und das MPTP-Modell.

1.2.1. Das 6-OHDA-Modell

Die biologischen Effekte von 6-OHDA (6-Hydroxydopamin), einem hydroxylierten Analogon Dopamins, wurden erstmals 1963 demonstriert, als Porter et al. zeigten, dass 6-OHDA zu einer lang anhaltenden

Noradrenalinentleerung in den sympathischen Nerven des Herzens führt (Schober, 2004).

Die systemische Gabe von 6-OHDA führt zu einer Zerstörung sympathischer Nervenendigungen mit konsekutivem Noradrenalinverlust im peripheren Nervensystem (Thoenen und Tranzer, 1968).

6-OHDA überwindet die Blut-Hirn-Schranke nicht und muss für seine Anwendung intrazerebral (intrazisternal, intraventrikulär oder direkt ins Hirnparenchym) appliziert werden.

Ungerstedt konnte 1968 zeigen, dass eine Applikation von 6-OHDA in den lateralen Ventrikel zu einer selektiven Degeneration dopaminerger Neurone führt (Ungerstedt, 1968).

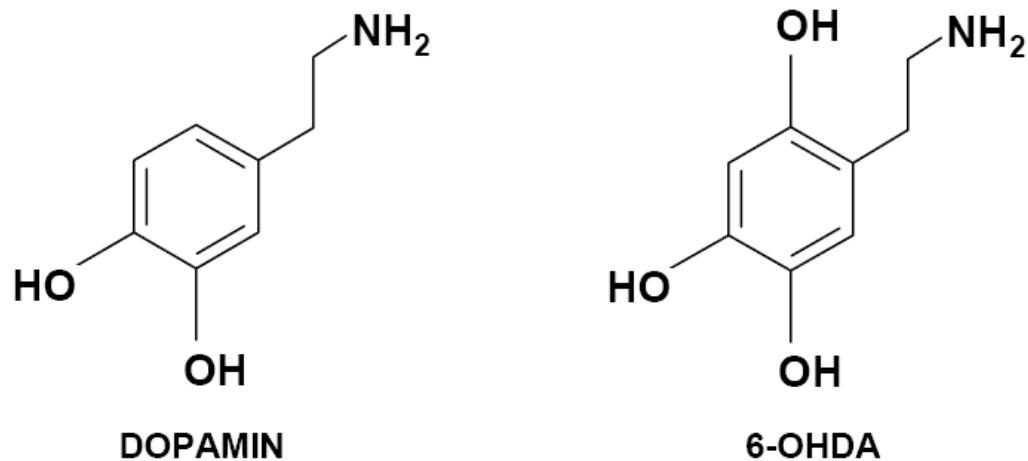


Abb.1.6.: Strukturformeln von Dopamin und 6-OHDA

1.2.1.1. Das akute 6-OHDA-Modell

Eine bilaterale Injektion von 6-OHDA in die Substantia nigra (SN) oder in das mediale Vorderhirnbündel (MFB) bei Ratten führt zu einem Verlust dopaminerger Neurone der SN mit schweren neurologischen Symptomen, die den Symptomen von Parkinson-Patienten ähneln (Zigmond et al., 1990).

Allerdings sind die Ratten durch die Akinese sowie Aphagie und Adipsie so schwer beeinträchtigt, dass eine intensive Pflege der Tiere nötig ist (Cenci et al., 2002).

Eine unilaterale Injektion von 6-OHDA in SN oder MFB (Mediales Vorderhirnbündel) resultiert in weniger ausgeprägten Verhaltensbeeinträchtigungen, aber die Gabe von Dopaminrezeptoragonisten wie Apomorphin, L-Dopa oder Dopamin-freisetzenden Substanzen wie Amphetamin führt zu einem messbaren Rotationsverhalten (Ungerstedt, 1971). Das Rotationsverhalten korreliert mit dem Grad des Dopaminverlustes. Ein Dopaminverlust von 75 - 90% ist dabei notwendig um verlässliches Drehverhalten zu messen (Hefti et al., 1980).

Dieses Modell wird auch Hemiparkinson-Modell genannt, da die intakte Hemisphäre als Kontrolle dient. Es eignet sich gut zur Testung von symptomatischen pharmakologischen oder chirurgischen (Transplantation dopaminergener Neurone) Therapien, da eine effektive Behandlung mit einer Abnahme der Rotation einhergeht.

Der wichtigste Unterschied zum IPS des Menschen ist vor allem der akut eintretende Effekt durch die Gabe von 6-OHDA verglichen mit dem chronisch-progressiven Verlauf des IPS.

1.2.1.2. Das subakute 6-OHDA-Modell

Die Injektion von 6-OHDA ins Striatum induziert eine langsame Degeneration des nigrostriatalen Systems über mehrere Wochen (Sauer und Oertel, 1994). Sauer und Oertel konnten einen Zelluntergang bis zu 16 Wochen nach Applikation von 6-OHDA feststellen. Der Untergang der dopaminergen Neurone scheint eine Konsequenz des Verlustes der axonalen Nervenendigungen mit nachfolgender retrograder Degeneration zu sein (Beal, 2001).

Obwohl Verhaltensbeeinträchtigungen in diesem Modell weniger ausgeprägt sind, scheint diese Anwendungsweise von 6-OHDA den chronisch-progredienten Verlauf des IPS beim Menschen besser wiederzuspiegeln.

1.2.1.3. Wirkmechanismus von 6-OHDA

6-OHDA wird nach intrazerebraler Administration selektiv durch den Dopamintransporter (DAT) in die Nervenendigungen dopaminergere Neurone aufgenommen. Innerhalb des Neurons akkumuliert das Neurotoxin im Zytosol oder auch - ähnlich MPTP - in Mitochondrien (Schober, 2004).

Die Selektivität von 6-OHDA gegenüber katecholaminergen Zellen war lange Zeit Gegenstand der Forschung. Einige Studien konnten eine nicht-selektive Schädigung von Zellen beispielsweise in mesencephalen Kulturen (Lotharius et al., 1999) nachweisen, ebenso wie Zellen ohne Katecholamin-Transporter unter anderem Neuroblastomzellen (Seitz et al., 2000). Allerdings scheinen sich diese Ergebnisse auf die experimentellen Bedingungen und die Situation in vitro zurückführen zu lassen (Blum et al., 2001).

Aktuell muss man davon ausgehen, dass 6-OHDA in vivo selektiv und dosisabhängig dopaminerge Neurone schädigt (Ding et al., 2004).

Entscheidender Faktor der Neurotoxizität von 6-OHDA scheint die Entstehung von oxidativem Stress zu sein. Eine Vielzahl von Studien konnte beweisen, dass 6-OHDA oxidativen Stress sowohl in vivo (Kumar et al., 1995) als auch in vitro (Choi et al., 1999) hervorruft.

6-OHDA unterliegt aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Dopamin den gleichen Abbauwegen. Für die Entstehung von ROS durch 6-OHDA scheinen daher zwei Mechanismen entscheidend zu sein: die Desaminierung durch die MAO und die nicht-enzymatische Autooxidation (Blum et al., 2001), bei der neben Wasserstoffperoxid, Superoxid- und Hydroxylradikale entstehen (siehe Kapitel 1.1.4.1). Hanrott et al. konnten darüber hinaus zeigen, dass neben der intrazellulären auch extrazelluläre Autooxidation von 6-OHDA stattfindet (Hanrott et al., 2006).

Die Bildung von ROS scheint dabei wesentlich durch freies Eisen verstärkt zu werden, welches die Fenton-Reaktion katalysiert (s. Kapitel 1.1.4.1). So

konnten beispielsweise He et al. erhöhte Eisenspiegel in SNpc und Striatum nach Injektion von 6-OHDA messen (He et al., 1996). Andere Studien konnten zeigen, dass Eisenchelatoren die neurotoxische Wirkung von 6-OHDA mindern (Ben-Sachar et al., 1991).

Die Entstehung von oxidativem Stress erklärt die Wirksamkeit von Antioxidantien gegenüber 6-OHDA (Blum et al., 2000) und die Beobachtung, dass bei transgenen Mäusen mit einer Überexpression von Superoxiddismutase (SOD) und Glutathionperoxidase weniger Neurone nach Gabe von 6-OHDA untergehen (Bensadoun et al., 1998).

Ein weiterer wesentlicher Faktor der zur Toxizität von 6-OHDA beiträgt, scheint die Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion zu sein (Glinka et al., 1997).

6-OHDA inhibiert direkt den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette. Dieser Effekt scheint unabhängig von der Entstehung von ROS zu sein und weder durch Antioxidantien noch durch Eisenchelatoren beeinflussbar zu sein (Glinka et al., 1996 und 1998).

Diese Beobachtung konnte in anderen Zellexperimenten nicht nachvollzogen werden (Wu et al., 1996).

Auch wenn die Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion nicht Hauptmechanismus der 6-OHDA-Toxizität zu sein scheint, spielt die Hemmung der Atmungskette dennoch eine wichtige Rolle. So konnten Lotharius et al. an mesencephalen Kulturen nachweisen, dass 6-OHDA einen ROS-assoziierten Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials verursacht (Lotharius et al., 1999).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass oxidativer Stress zu DNA-Defekten, Lipidperoxidationen und Desorganisation des Zytoskeletts sowie einer Hemmung der mitochondrialen Funktion mit Abnahme der ATP-Verfügbarkeit des dopaminergen Neurons führt. Beides zusammen führt zu Zelltod (Blum et al., 2001).

Proapoptotische Effekte von 6-OHDA konnten erstmals von Walkinshaw und Waters (1994) gezeigt werden. Sie beobachteten, dass geringe Konzentrationen von 6-OHDA biochemische und morphologische Kennzeichen von Apoptose in PC12-Zellen hervorrufen. In zahlreichen folgenden Studien konnte eine Beteiligung des p53-Transkriptionsfaktors und eine Aktivierung von Caspase-3 nachgewiesen werden (zusammengefasst in Blum et al., 2001), so dass davon ausgegangen werden muss, dass 6-OHDA proapoptotische Prozesse induziert.

1.2.2. Das MPTP-Modell

Das MPTP-Modell ist das am meisten verwendete und am besten untersuchteste Tiermodell der Parkinson-Forschung (Beal et al., 2001)

MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin) wurde entdeckt, nachdem sich bei einer Gruppe Heroinabhängiger, die sich mit MPTP verunreinigtes Heroin intravenös gespritzt hatten, Parkinson-ähnliche Symptome ausbildeten (Langston et al., 1983).

MPTP besitzt eine hohe Lipophilie und kann dadurch nach systemischer Applikation leicht die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Seine Toxizität induziert MPTP, indem es in Astrozyten durch die MAO-B zu MPDP⁺ (1-Methyl-4-phenyl-1,2-dihydroxypyridiniumion) umgesetzt wird und anschließend in einem zweiten Schritt spontan zu dem neurotoxischen Metabolit MPP⁺ (1-Methyl-4-phenylpyridiniumion) oxidiert (Markey et al., 1984).

MPP⁺ wird von den Astrozyten freigesetzt und über den plasmaständigen Dopamintransporter (DAT) in die dopaminergen Neurone aufgenommen (Chiba et al., 1985).

Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass die Gabe von MAO-B-Inhibitoren wie beispielsweise Selegilin zu einer verminderten Toxizität führt (Heikkila, 1984). Zudem konnte demonstriert werden, dass Knockout-Mäuse ohne DAT vor MPTP-Toxizität geschützt sind (Bezard et al., 1999). Aufgenommenes MPP⁺ akkumuliert in den Mitochondrien aller dopaminergen Neurone. MPP⁺ hemmt selektiv den Komplex I der

Atmungskette und dadurch den Elektronentransport. Die Zelle verarmt an ATP, es entstehen freie Radikale, die zum Tod der dopaminergen Neurone führen (Beal et al., 1993).

Systemische Applikation von MPTP führt zu einer bilateralen Degeneration der SN bei einer Vielzahl von Spezies wie Mäusen, Katzen und Primaten (Betarbet et al., 2002). Allerdings variiert die Suszeptibilität zwischen verschiedenen Spezies und Rassen erheblich. So sind Ratten nahezu resistent gegenüber MPTP, weil sie MPTP nicht metabolisieren können. Bei Mäusen hingegen variiert die Wirkung je nach Stamm, Alter und Geschlecht der Mäuse (Sundstrom et al., 1987).

Nachteilig am MPTP-Modell ist zudem, dass die induzierten Parkinson-Symptome sowohl bei Affen (Eidelberg et al., 1986) als auch bei Mäusen (Sedelis et al., 2000 und 2001) spontane Rückbildung zeigen können.

Die morphologischen und biochemischen Veränderungen wiesen ab dem 4. Tag nach Injektion keine Progredienz und z.T sogar Erholung auf (Mitsumoto et al., 1998). Ebenso konnten keine Lewy-Körperchen festgestellt werden (Forno et al., 1988).

1.3. Ziele der Arbeit

6-OHDA, welches durch seine Schädigung dopaminergener Neurone und den progressiven Verlust nigraler Neurone nach intrastriärer Injektion geeignet ist, verschiedene Aspekte des IPS wiederzugeben, ist bislang nur an Ratten hinreichend charakterisiert.

In der vorliegenden Arbeit soll das 6-OHDA-Modell der Maus detailliert beschrieben werden. Der Zeitverlauf im Hinblick auf dopaminergen Zellverlust, Dopaminkonzentrationen, Radikalentstehung als Marker für oxidativen Stress sowie Verhaltensbeeinträchtigungen nach intrastriärer Injektion von 6-OHDA soll im Maus-Modell charakterisiert werden.

Da in der Parkinson-Forschung zunehmend transgene Tiere Verwendung finden kann eine Ausweitung der Methodik auf 6-OHDA sinnvoll sein, da es gegenüber MPTP – dem bislang am häufigsten verwendeten Toxin – gewisse Vorteile hat, z.B in Hinblick auf die Reversibilität der Läsion.

2. Material und Methoden

2.1. Tiere und Tierhaltung

Alle Experimente wurden an adulten (9-12 Wochen alten) männlichen Mäusen, Stamm C57Bl/6, Standardgewicht 20-32 g, bezogen von der Firma Charles River, Sulzfeld durchgeführt.

Nach Ankunft der Tiere konnten sie sich fünf Tage an den institutseigenen Tierstall gewöhnen, bevor sie für Experimente eingesetzt wurden. Die Mäuse wurden unter Standardbedingungen (Raumtemperatur $23 \pm 1^\circ\text{C}$, relative Luftfeuchtigkeit $55 \pm 5\%$, zwölfständiger Hell-Dunkel-Rhythmus, Licht an um 6:30 Uhr) gehalten. Ein Kunststoffkäfig mit Metallabdeckung (Makrolon®) wurde mit bis zu maximal 6 Tieren besetzt. Die Tiere hatten freien Zugang zu Standardfutter (Altromin®) und Trinkwasser aus Kunststoffflaschen.

Die durchgeführten Tierversuche wurden von der zuständigen Behörde (Regierungspräsidium Gießen) genehmigt.

2.2 Eingesetzte Substanzen und Chemikalien

2.2.1. Operation und stereotaktische Läsion

Chloralhydrat	Merck, Darmstadt
Bepanthen® Augensalbe	Roche
6-OHDA (6-Hydroxydopaminbromid)	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
Ascorbinsäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumchloridlösung 0,9%	Braun, Melsungen
Na-Salicylat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

2.2.2. Probenaufbereitung für die HPLC und Durchführung

Acetonitril	Roth
Di-Natrium-EDTA	Sigma Aldrich
Dopamin (Eichlösung)	Sigma Aldrich
DOPAC (Eichlösung)	Sigma Aldrich
Methanol	Riedel-de-Haën
Natriumacetat wasserfrei p.a.	Merck
N Perchlorsäure (HClO ₄)	Kluka
Oktansulfonsäure (Natriumsalz)	Sigma Aldrich
HClO ₄ 60% p.a.	Merck
HCL min. 32%	Riedel-de-Haën
H ₂ O	Millipore
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Phosphorsäure	Sigma Aldrich
Triethylamin	Sigma Aldrich

2.2.3. Anfertigung der Gehirnschnitte

Methanol	Merck
Formaldehyd 37% stabilisiert	Merck
Eisessig	Merck
Paraformaldehyd	Merck
Saccharose	Sigma Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck
Natriumazid 0,1%	Sigma Aldrich
Aqua dest.	Merck
NaOH	Merck
Ethylenglycol	Merck
Glyzerin 87 %	Merck

2.2.4. Immunhistochemie

TH-Antikörper (anti-tyrosine hydroxylase, made in mouse)	Boehringer, Mannheim
TH-Antikörper IgG (H+L) (anti-mouse, made in horse, biotyniliert)	Vector, Alexis, USA
Normal House Serum (NHS)	Vector
Streptavidin	Dako, Dänemark
Triton X-100	Sigma Aldrich
Wasserstoffperoxid H ₂ O ₂	Sigma Aldrich
Methanol	Merck
3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid	Sigma Aldrich
Gelatine	Merck
Ethanol 96%	Merck
Xylol	Merck
Chromalaun	Merck
Corbit Balsam	Merck

2.2.5 Verwendete Lösungen und deren HerstellungPB-Puffer: Stammlösung, 0,1 M

(Ansatz für 10 Liter)

Na ₂ HPO ₄	115 g
NaH ₂ PO ₄	26,22 g

pH ist 7,4; bei Abweichen mit 1 M NaOH einstellen und anschließend filtrieren

Saccharose, 25%

(Ansatz für 100 ml)

Saccharose	25g
PB-Puffer, 0,1 M	100 ml

Antifreeze

(Ansatz für 1 Liter)

Na ₂ HPO ₄	5,18 g
NaH ₂ PO ₄	1,57 g
Aqua dest	400 ml
Ethylenglycol	300 ml
Glyzerin	300 ml

Paraformaldehyd-Lösung (PFA), 8%

(Ansatz für 500 ml)

Aqua dest	241,66 ml
(wird in der Mikrowelle erwärmt)	
PFA	20 g
(unter Rühren hinzugeben)	
PB-Puffer	
NaOH, 30 %	1 Tropfen
(Lösung filtrieren)	

2.3 Verwendete Geräte**2.3.1. Stereotaktische Läsion**

Stereotaktischer Rahmen	David Kopf, Tjunga, Californien, USA
OP-Besteck	Aesculap
Zahnbohrer	
Mikroliterspritzen	Hamilton, Schweiz
Einwegspritzen – und Kanülen	Sterican

2.3.2. HPLC**2.3.2.1 Herstellung der Homogenisate**

Plastikreaktionsgefäße 1,6 ml	Biozym Diagnostics GmbH, Hess. Oldendorf
-------------------------------	---

Ultraturrax	Ultra Turrax T 5, Bachofer, Reutlingen
Zentrifuge	Hermle Z 252 MK, Gosheim
Membranfilter mit 0,2 µm Porenweite	Spartan 13/0.2 RC; Schleicher & Schuell, Dassel

2.3.2.2. Bestimmung von DA, HVA und 2,5-DHBA

Pumpe	M 300, Gynotek, Germering
Flussrate	0,5 ml/min
Autosampler	GINA 50, Gynotek, Germering
Temperatur im Probenraum	4 °C,
Injektionsvolumen	20 µl
Säule	Vertex 125×3 mm mit Vorsäule 5×3 mm, Nucleosil 120-3 C-18, Knauer, Berlin
Detektor	BAS LC 4B, Bioanalytical Systems, West Lafayette, USA
Arbeitselektrode	Glassy-Carbon, BAS, West Lafayette, USA
Referenzelektrode	Ag/AgCl, BAS, West Lafayette, USA
Detektorempfindlichkeit	2 nA/V
Oxidationspotential	750 mV
Temperatur der Messzelle	22 °C

2.3.2.3. Bestimmung von Salicylat

Degasser	4-Kanal-Degasser, Knauer, Berlin
Pumpe	Beckmann 114 M, Solvent Delivery Modul, USA
Flussrate	1 ml/min
Autosampler	Gilson/Abimed 401/231, Abimed Analysentechnik GmbH, Langenfeld
Probentemperatur	26 °C

Injektionsvolumen	20µl
Säule	Vertex 250×4 mm mit Vorsäule 5×4 mm Nucleosil 100 C 18, Knauer, Berlin
Detektor	UV-Detektor ERC 7210, Alteglofsheim $\lambda = 295 \text{ nm}$

2.3.3. Herstellung der Gehirnschnitte

Kryostat Frigocut 2800 E Frigocut Reichert-Jung, Nussloch

2.3.4. Mikroskopische Analyse

Mikroskop Leica DM RB Leica, Bensheim, Deutschland
C.A.S.T Software 2.00.04 Olympus, Dänemark, A/S 1999
Objektträgertisch, motorbetrieben
Microcator mit digitaler Auszählbox
Farb CCD Kamera
PC-System mit Monitor und MS-Windows

2.3.5. Verhaltenstestung

Rotarod® TSE Technical & Scientific
Equipment GmbH, Bad
Homburg

2.4. Stereotaktische Läsionen

Bei dem 6-OHDA-Modell der Maus wird das Neurotoxin 6-OHDA einmalig stereotaktisch unilateral intrastriatal injiziert.

Dazu wurden 4 µg 6-OHDA in 2µl physiologischer Kochsalz-Lösung mit 0,02% Ascorbinsäure als Oxidationsschutz gelöst. Die Injektion erfolgte nachdem die Mäuse mit Chloralhydrat (400 mg/kg, intraperitoneal) narkotisiert wurden. Nach Überprüfung der Narkosetiefe durch Schmerzreflexprüfung und festgestellter Areflexie wurde der Kopf der

Maus intraaural in einem stereotaktischen Rahmen (David Kopf, Tijunga, Californien) fixiert, wobei sich der Zahnbalken des Rahmens in der intraauralen Linie (TB: +/- 0) befand. Mit einem ca. 1 cm langen Schnitt wurde die Kopfhaut entlang der Medianen eröffnet und der Schädelknochen freigelegt. Der Schädelknochen wurde vom Periost befreit. Ausgehend vom Bregma als Referenzpunkt für stereotaktische Koordinaten (Stereotaktische Koordinaten nach dem Hirnatlas von Franklin und Paxinos, 1997) wurde mit einem elektrischen Zahnbohrer punktuell die Kalotte eröffnet.

Es folgte die Injektion mit Hilfe von Mikroliterspritzen (10 µl Hamiltonspritze), die am Arm eines Mikromanipulators befestigt waren, mit einer Injektionsgeschwindigkeit von 0,5 µl/min ins linke Striatum. Die Nadel wurde 5 Minuten am Injektionsort belassen, um eine ausreichende Diffusion ins Gewebe zu sichern. Zwischen den einzelnen Injektionen wurde die Injektionslösung lichtgeschützt auf Eis gelagert.

Das rechte Striatum erhielt eine korrespondierende Menge der Trägersubstanz (NaCl) als Kontrolle.

Ein Teil der Mäuse wurde als Kontrollgruppe für die Verhaltenstestung sham-lädiert, d.h. sie erhielt in linkes und rechtes Striatum äquivalente Volumina NaCl.

Anschließend wurde die Wunde gesäubert und vernäht. Die Mäuse wurden postoperativ unter einer Infrarotlampe aufbewahrt, um sie vor Unterkühlung zu schützen. Die Kornea der Tiere wurde zum Schutz vor Austrocknung und Fremdkörpern mit Bepanthen® Augensalbe versorgt.

Tab.3.1. Zielkoordinaten für stereotaktische Läsion

Zielgewebe	Koordinaten
Striatum	AP + 0,4 mm
	ML + 1,8 mm
	VD – 3,5 mm

2.5. Gewebeentnahme und -aufarbeitung

2.5.1. Gewebeentnahme und -aufarbeitung für die HPLC-Bestimmung

Die Mäuse wurden 25 min, 2h, 4h, 3d, 7d, 14d, 28d und 56 d nach stereotaktischer Injektion von 4µg 6-OHDA durch zervikale Dislokation getötet. Die Gehirne wurden rasch entnommen und zur weiteren Aufarbeitung vorbereitet.

100 min vor der Tötung erhielten einige Mäuse eine intraperitoneale Injektion von Natriumsalicylat (100mg/kg) um eine Radikalmessung zu ermöglichen.

Nach vorsichtigem Entfernen der Dura mater wurden die Gehirne entnommen und auf einer eisgekühlten Metallplatte linkes und rechtes Striatum sowie linke und rechte Substantia nigra disseziert. Die Gewebstücke wurden gewogen und anschließend in Plastikreaktionsgefäße (1,6ml; Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) überführt, die zur Fällung von Proteinen 500µl 0,4 N-Perchlorsäure (HClO₄) enthielten. Mittels eines Ultraturraxes (Ultra Turrax T5, Bachofer, Reutlingen) erfolgte die Homogenisation der Gewebe bei 20000 Umdrehungen pro Minute (UPM) für jeweils eine Minute. Die Proben wurden anschließend für 15 - 60 Minuten bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt, um eine quantitative Proteinfällung zu erreichen. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 5000-8000 UPM (entspricht 13.000 g) bei 4°C für 15 Minuten. Der Überstand wurde durch einen Membranfilter mit 0,2 µm Porenweite (Spartan 13/0.2 RC, Schleicher & Schuell, Dassel) filtriert und entweder sofort analysiert oder bei -70°C tiefgefroren.

2.5.2. Gewebeentnahme und -aufarbeitung für histologische Untersuchung

Analog der Gewebeentnahme und -aufarbeitung zur HPLC-Bestimmung wurden die Mäuse nach 3, 7, 14, 28 und 56 Tagen nach Gabe von 4µg 6-OHDA und erfolgter RotaRod-Testung durch zervikale Dislokation getötet und dekapitiert. Nach Entnahme des Gehirns wurde zunächst das frontale

Drittel durch einen senkrechten Schnitt abgetrennt und der dorsale Teil für 24 - 48 Stunden in einer Fixierlösung (8 Teile Methanol, 2 Teile Formaldehyd, 1 Teil Essig) überführt.

2.6. Elektrochemische Auswertung mittels HPLC

Zur Bestimmung von Neurotransmittern und ihren Metaboliten sowie den Hydroxylierungsprodukten standen mehrere Chromatographiemethoden zur Verfügung.

Zur Analyse der Homogenisate wurden jeweils 20 µl des Homogenisats durch den Autosampler injiziert. Das Signal für DA, HVA und 2,5-DHBA wurde elektrochemisch detektiert, Salicylat wurde mittels UV-Detektion bestimmt.

Die Analysezeit betrug 20 min für die elektrochemische Detektion und 5 min für die UV-Detektion.

Die Gehaltsbestimmung der jeweiligen Substanz wurde über eine externe Kalibriergerade (7-Punkt-Kalibrierung) aus der Fläche unter den Peaks ermittelt (Integrationssoftware Chromeleon 6.20 Dionex, Germering).

Die Kalibrierung wurde vor jeder Messreihe durchgeführt. Dafür wurden je 20 µl der Eichlösung in jeweiliger Konzentration eingespritzt. Das Detektionsminimum lag bei einer Konzentration von 5×10^{-10} mol/l.

2.6.1. Bestimmung von Neurotransmittern und ihren Metaboliten sowie Hydroxylradikalen mittels elektrochemischer Detektion

Die Bestimmung von Dopamin und seinem Metabolit Homovanillinmandelsäure (HVA) sowie dem Hydroxylierungsprodukt der Salicylsäure 2,5-Dihydrobenzoesäure (DHBA) erfolgte mittels elektrochemischer Detektion. (Technische Daten siehe Kap. 2.3.2.2.)

Die **mobile Phase** für die Bestimmung von DA, HVA und 2,5-DHBA enthielt:

Oktansulfonsäure-Natriumsalz (Ionenpaarreagenz)

0,14 g

EDTA	0,1 g
Triethylamin	6 ml
Acetonitril	35 ml
Millipore® Wasser	ad 1000ml
Phosphorsäure zum Einstellen von	pH 2,95

Die Lösung wurde mit Phosphorsäure auf einen pH-Wert von etwa 3,00 eingestellt. Anschließend wurde diese Pufferlösung durch einen Membranfilter mit einer Porenweite von 0,45 µm filtriert. 35 ml der Lösung wurden durch Acetonitril ersetzt. Danach wurde die Lösung mit Phosphorsäure genau auf einen pH von 2,95 eingestellt.

Das Fließmittel wurde bei 4 °C gelagert und wöchentlich frisch hergestellt.

2.6.2. Bestimmung von Natriumsalicylat mittels UV-Detektion

Die Ermittlung von Salicylat erfolgte mittels UV-Detektion (Technische Daten siehe Kapitel 2.3.2.3.)

Die **mobile Phase** für die Bestimmung von Salicylat enthielt:

Kaliumhydrogenphosphat	2,722 g
Millipore® Wasser	ad 1000 ml
Acetonitril	697 ml
Phosphorsäure zum Einstellen von	pH 2,5

Die Herstellung des Fließmittels mit den angegebenen Substanzen erfolgte analog 2.6.1.

2.7. Immunhistochemie und histologische Untersuchung

2.7.1. Anfertigen von Gehirnschnitten

Nach 24-stündiger Postfixation in 4% PFA-Lösung wurden die Gehirne für 1,5 Tage in 30% Saccharose/PBS-Lösung dehydratisiert. Nachdem die Gehirne abgesunken waren, wurden sie in Isopentan bei -30 °C

schockgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert. Mittels Kryostat (Modell 2800, Frigocut Reichert-Jung, Nussloch) wurden bei -18 bis -20°C koronare Mittelschnitte in einer Dicke von $25\text{ }\mu\text{m}$ angefertigt und auf drei Serien aufgeteilt. Die erste Serie wurde in $0,1\text{ M}$ PBS-Lösung überführt. Alle weiteren Schnittserien wurden in Antifreeze (Herstellung siehe Kapitel 2.2.5) bei -20°C bis zur Färbung aufbewahrt.

2.7.2. TH-Immunreaktivität

Die Gehirnschnitte wurden mittels der „free floating“-Technik auf Tyrosinhydroxylase (TH)-Immunreaktivität gefärbt. Dazu wurden die Schnitte dreimal mit $0,1\text{ M}$ PBS gewaschen und anschließend die endogene Peroxidaseaktivität mit 3% H_2O_2 und 10% Methanol in PBS (10 ml bestehend aus 1 ml Methanol, 1 ml 30% H_2O_2 und 8 ml $0,1\text{ M}$ PB-Lösung) unterdrückt. Nachdem erneut dreimal für je 10 Minuten mit $0,1\text{ M}$ PB-Lösung gewaschen wurde, wurden die Schnitte für 60 Minuten mit 5% Normal House Serum (NHS) und 3% Triton X-100 in PBS präinkubiert. Es folgte die Inkubation mit TH-Antikörper (anti-tyrosine hydroxylase made in mouse) in einer Endkonzentration von $1:4000$ in PBS mit 2% iger NHS und 3% Triton X-100 über Nacht ($15\text{-}20\text{ Stunden}$) bei 4°C .

Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte zunächst wieder dreimal in $0,1\text{ M}$ PB-Lösung gewaschen, bevor sie mit dem 2. Antikörper (anti-mouse, made in horse, biotinyliert) in einer Verdünnung von $1:200$ in PBS mit $0,3\%$ Triton X-100 für 60 Minuten inkubiert wurden. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit $0,1\text{ M}$ PB-Lösung erfolgte eine 60-minütige Inkubation mit Streptavidin ($1:200$ in $0,1\text{ M}$ PB-Lösung). Die Färbung wurde mit einer $0,05\%$ -igen Lösung von $3,3'$ -Diaminobenzidin (DAB) unter Zusatz von $0,01\%$ H_2O_2 in $0,1\text{ M}$ PB-Lösung für $1\text{-}2\text{ Minuten}$ durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte erneut dreimal mit $0,1\text{ M}$ PB-Lösung gewaschen, auf gelatinisierte Objektträger aufgezogen und über Nacht getrocknet. Auf einen Objektträger kamen alle Schnitte eines jeweiligen Gehirns. Zum Gelatinisieren wurden 7 g Gelatine in 300 ml H_2O 1 Stunde quellen gelassen. Zu der gelösten erwärmten Gelatine wurden $0,18\text{ g}$

Chromalaun hinzugegeben und auf 40°C erwärmt. Nach anschließender Filtrierung wurde die Lösung zum Gelatinisieren der Objektträger in ein Wasserbad gestellt. Am darauffolgenden Tag wurden sie in aufsteigender Ethanolreihe entwässert, für 60 Minuten in Xylol belassen und mit Corbit-Balsam konserviert und eingedeckelt.

2.7.3. Mikroskopische Analyse

Die mikroskopische Analyse erfolgte lichtmikroskopisch computerunterstützt mittels C.A.S.T (Computer assisted stereological toolbox, Olympus, Denmark).

Diese Methode ermöglicht die Auswertung dreidimensionaler Strukturen, in dem diese in zweidimensionale Schnitte zerlegt werden.

Dazu unterteilt die Software vorher markierte Areale unter Berücksichtigung der jeweiligen Schnittdicke (z-Achse) in einzelne Proben (Samples) (x-, y-Achse). Je nach Auszählfraktion wird ein Teil ausgezählt; das Endergebnis wird hochgerechnet.

Die Hirnschnitte wurden „blind“ ausgezählt. Beide Hirnhälften und jeweils SN und VTA wurden getrennt voneinander analysiert.

Die Identifikation der SN und der VTA erfolgte durch anatomische Eckpunkte wie des N. oculomotorius und des Lemniscus medialis sowie unter Zuhilfenahme des Hirnatlas von Franklin und Paxinos (Franklin und Paxinos, The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 1997).

Zu Beginn wurde der jeweilige Gehirnschnitt in 4×Vergrößerung betrachtet.

Die Software erlaubt eine Bildbearbeitung des durch eine Kamera digitalisierten optischen Bildes am Computer. Dazu wurden die jeweiligen Bereiche umrandet. Anschließend erfolgte die Auszählung in 100×Vergrößerung.

Das Cast-System wählt dabei systematisch-zufällig aus vorher markierten Strukturen Bereiche mit einer Auszählfraktion von 30% aus.

Gezählt wurden nur Zellkerne bzw. Neurone ohne sichtbaren Zellkern durch zu intensive Färbung (Menge der Tyrosinhydroxylase im

Zytoplasma zu hoch), die innerhalb der vorher festgelegten Umgrenzung und innerhalb des Auszählfensters (Frame-Grabber) lagen.

Das ausgezählte Ergebnis wurde auf 100% hochgerechnet. Der Auswerter war während der Datenerhebung hinsichtlich der Schädigung (6-OHDA versus sham) verblindet.

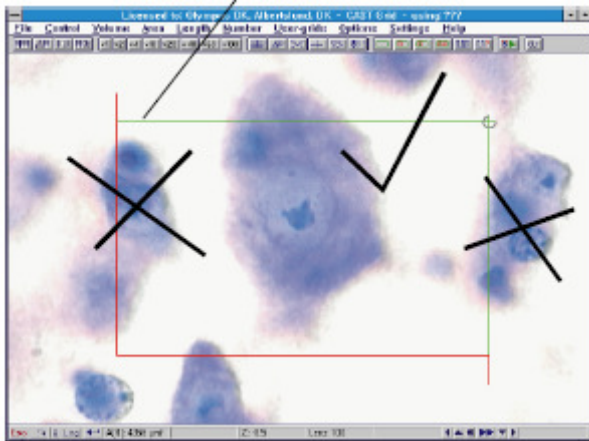


Abb. 2.1.: Beispiel Bildschirmauszählung



Abb. 2.2.: Beispiel markierte SNpc

2.8. Verhaltenstestung

Ziel der Messung war es, Veränderungen der lokomotorischen Aktivität der Tiere in unterschiedlichen Behandlungsgruppen im Zeitverlauf festzuhalten. Dazu wurden die Tiere prä- und postläsionem (3., 7., 14., 28. und 56.Tag postoperativ) getestet.

Die Verhaltensanalyse wurde mittels Rotarod® (TSE Technical & Scientific Equipment GmbH, Bad Homburg) durchgeführt.

Gemessen wurde die motorische Koordination von Vorder- und Hinterläufen mittels Messung der Zeit, die die Tiere auf dem sich drehenden Stab balancieren konnten.

Dabei wurde eine sogenannte Rattenspindel, Durchmesser 7,3 cm, verwendet. Die Tiere wurden einzeln gegen die Drehrichtung auf die Spindel gesetzt. Jede Maus war in einer eigenen Bahn untergebracht. Es wurden 5 Tiere parallel untersucht. Die Messung erfolgte mittels eines Infrarotbalkens, der den Fall der Maus von der Spindel registrierte. Damit wurde am Computer automatisch die Zeit gemessen.

Zur Vorbereitung wurden alle Tiere 5 Tage vor stereotaktischer Läsion bei konstanter Geschwindigkeit von 10 RPM und 20 RPM jeweils 300 Sekunden trainiert, sodass sich alle Tiere am Vortag der Behandlung mindestens 200 Sekunden bei 20 RPM auf der Spindel halten konnten.

Am Tag der jeweiligen Messung musste jede Maus 5 Läufe absolvieren bzw. die Messung wurde bei Erreichen der Maximalzeit von 300 Sekunden abgebrochen. Die Tiere mussten sowohl bei konstanter Laufzeit von 20 RPM als auch bei einem Beschleunigungsmodus (Beschleunigung von 15 auf 25 RPM in 150 Sekunden) laufen.

Es wurden unilateral striatal-lädierte Mäuse wie auch sham-lädierte Mäuse als Kontrollgruppe untersucht. Der Auswerter war hinsichtlich der Schädigung (6-OHDA versus sham) verblindet. Die Messung erfolgte immer zur gleichen Tageszeit.

2.9. Statistik

Alle Daten sind als Mittelwert \pm S.E.M. angegeben. Für die statistische Auswertung wurde eine ANOVA mit einem post-hoc Dunnett's test durchgeführt, wenn einzelne Daten mit der Kontrollgruppe verglichen wurden bzw. ein post-hoc Tukey test wenn verschiedenen Zeitpunkte verglichen wurden. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgesetzt.

3. Ergebnisse

3.1. Neurochemische Untersuchung

3.1.1. Effekte der 6-OHDA-Läsion auf Gewebekonzentrationen von Dopamin in Striatum und Substantia nigra

6-OHDA induziert einen lang anhaltenden graduellen Dopaminverlust in Striatum und Substantia nigra.

Im Striatum zeigte sich 25 Minuten nach Injektion von 4 µg 6-OHDA eine Dopaminkonzentration von $100 \pm 3,19$ % verglichen mit der sham-lädierten Seite. Nach 2 Stunden wurde eine vorübergehende Konzentration von $126,5 \pm 5,84$ % gemessen, die nach 4 Stunden auf $107,9 \pm 9,0$ % abfiel. In den folgenden 3 Tagen war ein Dopaminabfall im Striatum auf $21,1 \pm 4,1$ % (* $p < 0,05$) zu beobachten. An den folgenden Messzeitpunkten zeigten sich stabile Werte in diesem Bereich mit $27,5 \pm 9,0$ % (* $p < 0,05$) am 7. postoperativen Tag; $14 \pm 6,1$ % (* $p < 0,05$) am 14. Tag; $30 \pm 8,2$ % (* $p < 0,05$) am 28. Tag und $7 \pm 3,1$ % (* $p < 0,05$) am 56. Tag.

Der Abfall der Dopaminkonzentration am 3. postoperativen Tag im Striatum erreicht statistische Signifikanz (# $p < 0,05$) verglichen mit allen späteren Zeitpunkten. Alle folgenden Werte erreichen keine statistische Signifikanz.

Auf der sham-lädierten Seite zeigte sich ebenfalls eine Abnahme der Dopaminkonzentration von $28,8 \pm 4,5$ % am 3. Tag; $34 \pm 4,8$ % am 7. Tag; $31,6 \pm 4,1$ % am 14. Tag; $28,3 \pm 4,5$ % am 28. Tag und $25,5 \pm 4,9$ % am 56. Tag.

In der Substantia nigra wurde ein unterschiedlicher Zeitverlauf der Dopaminkonzentration verglichen mit dem Striatum beobachtet. Im Gegensatz zum Striatum zeigte sich in der SN 25 Minuten nach Injektion von 4 µg 6-OHDA eine relativ unveränderte Dopaminkonzentration von $82 \pm 16,8$ % sowie $80,1 \pm 7,5$ % nach 2 Stunden und $90,7 \pm 14,7$ % nach 4

Stunden. Am 3. Tag wurde eine stabile Dopaminkonzentration von $103,8 \pm 10,7 \%$ beobachtet. Anschließend kam es zum Abfall der Werte auf $57,3 \pm 7,8 \%$ (* $p < 0,05$) am 7. Tag. Im Bereich dieses Niveaus blieben die Werte stabil bis zum Ende der Messreihe mit $55,1 \pm 13,2 \%$ (* $p < 0,05$) am 14. Tag; $68,5 \pm 10,3 \%$ (* $p < 0,05$) am 28. Tag und $45,5 \pm 17,7 \%$ (* $p < 0,05$) am 56. Tag.

Die Abnahme der Dopaminkonzentration auf der sham-lädierten Seite im Bereich der Substantia nigra liegt im Bereich der Konzentrationsabnahme im Bereich des sham-lädierten Striatums.

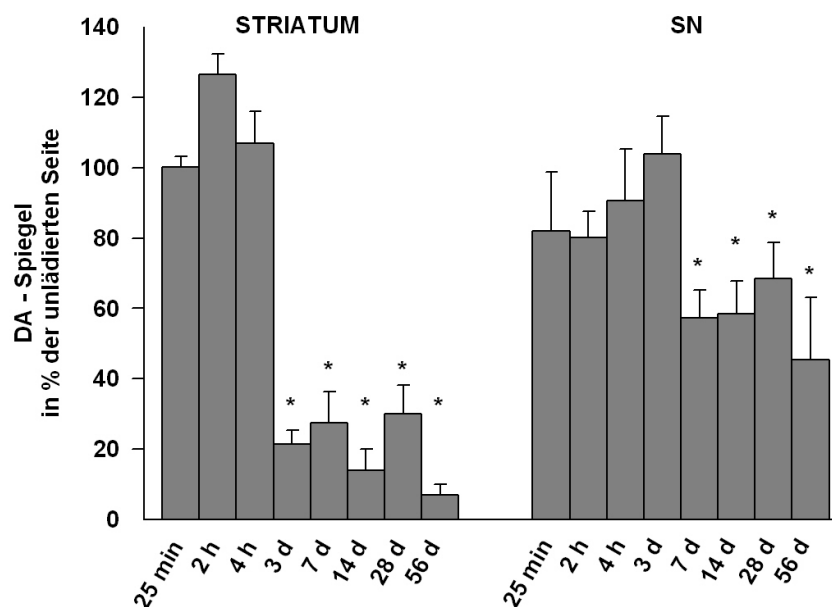


Abb. 1: 6-OHDA induzierte Veränderungen der Gewebekonzentration von Dopamin in Striatum und Substantia nigra nach 25 min., 2 h, 4 h, 3 d, 7 d, 14 d, 28 d und 56 d ($n = 4$ bis 12 Mäuse pro Gruppe) nach Injektion von $4 \mu\text{g}$ 6-OHDA ins linke Striatum und einer korrespondierenden Menge NaCl ins rechte Striatum. Dabei wurde der Wert der sham-lädierten Kontrollseite auf 100% gesetzt und der Wert der Läsionsseite jeweils für Striatum und Substantia nigra als prozentualer Anteil davon angegeben (Mittelwert \pm SEM)(* $p < 0,05$).

3.1.2. Effekte der 6-OHDA-Läsion auf Dopaminumsatz in Striatum und Substantia nigra

6-OHDA induziert einen erhöhten Dopaminumsatz sichtbar an der Erhöhung des Dopamin/HVA Quotienten.

25 Minuten nach Injektion von 6-OHDA ins linke Striatum zeigte sich bereits ein Anstieg auf $130,9 \pm 4,8 \%$ (* $p < 0,05$) verglichen mit der kontralateralen sham-lädierten Seite.

Nach 2 Stunden lagen die Werte bei $123,9 \pm 8,5 \%$ (* $p < 0,05$) und nach 4 Stunden bei $141,2 \pm 19,7 \%$ im Striatum. Nach 3 Tagen kam es zu einem leichten Anstieg des Dopaminumsatzes auf $166,3 \pm 8,9 \%$ (* $p < 0,05$). Alle folgenden Werte blieben ab dem 7. postoperativen Tag auf hohem Niveau stabil. Allerdings zeigte sich hier eine große Schwankungsbreite innerhalb der Werte ($528,9 \pm 123,77 \%$, (* $p < 0,05$) am 7. Tag; $525,3 \pm 136,87 \%$, (* $p < 0,05$) am 14. Tag; $460,96 \pm 119,33 \%$, (* $p < 0,05$) am 28. Tag und $543,32 \pm 99,39 \%$, (* $p < 0,05$) am 56. Tag).

Ähnlich des Zeitverlaufes im Striatum war in der Substantia nigra ein erhöhter Dopaminumsatz zu beobachten. Der HVA/DA Quotient stieg nach 25 Minuten auf $116,3 \pm 17,5 \%$ verglichen mit der kontralateralen Seite. Nachfolgend blieb der Quotient in diesem Wertebereich stabil ($105,7 \pm 18,3 \%$ nach 2 Stunden; $141,8 \pm 13,6 \%$ nach 4 Stunden und $102,9 \pm 12,9 \%$ nach 3 Tagen). Nach 7 Tagen kam es ebenso wie im Striatum zum größten Anstieg des HVA/DA Quotienten. Am 7. postoperativen Tag lag der Dopaminumsatz bei $240 \pm 44,2 \%$, (* $p < 0,05$). Anschließend fiel der HVA/DA Quotient wieder ab ($127 \pm 31,62 \%$ am 14. Tag; $179,3 \pm 51,1 \%$ am 28. Tag und $118,9 \pm 7,8 \%$ am 56. Tag). Hier war ähnlich des Striatums die hohe Schwankungsbreite der Werte auffällig.

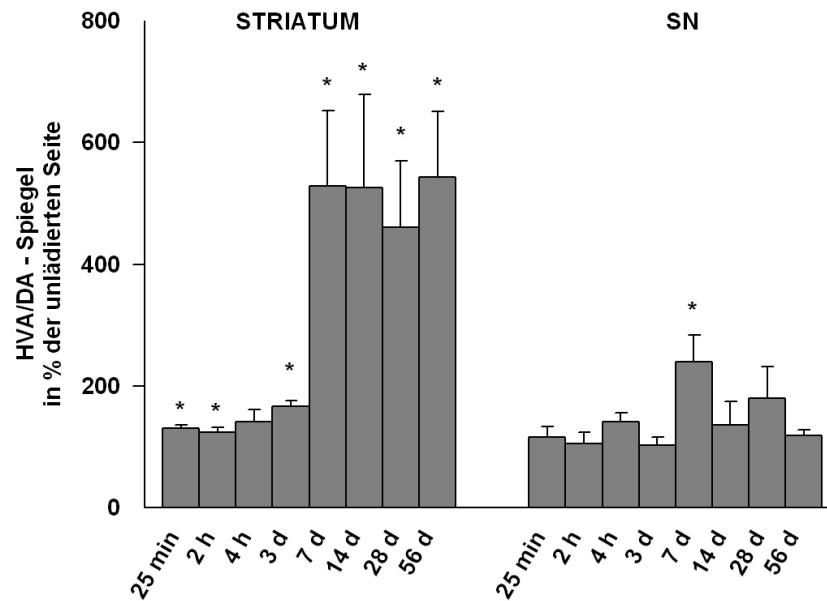


Abb. 2: 6-OHDA induzierte Veränderungen des Quotienten von HVA/DA als Zeichen neuronaler Schädigung in Striatum und Substantia nigra nach 25 min., 2 h, 4 h, 3 d, 7 d, 14 d, 28 d und 56 d ($n = 4$ bis 12 Mäuse pro Gruppe) nach Injektion von $4 \mu\text{g}$ 6-OHDA ins linke Striatum und einer korrespondierenden Menge NaCl ins rechte Striatum. Dabei wurde der Wert der sham-lädierten Kontrollseite auf 100% gesetzt und der Wert der Läsionsseite jeweils für Striatum und Substantia nigra als prozentualer Anteil davon angegeben (Mittelwert \pm SEM)(* $p < 0,05$).

3.1.3. Effekte der 6-OHDA-Läsion auf Gewebekonzentration von 5-Hydroxyindolessigsäure in Striatum und Substantia nigra

Die Injektion von $4 \mu\text{g}$ 6-OHDA beeinflusste die Gewebekonzentration von 5-HT kaum.

Sowohl in Striatum als auch in der Substantia nigra zeigte sich keine signifikante Konzentrationszu bzw. -abnahme von 5-HT im Vergleich zur sham-lädierten Seite.

Die Konzentration im Bereich des Striatums blieb beispielsweise zwischen $91,2 \pm 16,73 \%$ bei 25 Minuten; $106,3 \pm 15,71 \%$ bei 2 Stunden; $90,6 \pm 21,4 \%$ bei 4 Stunden; $117,3 \pm 11,37 \%$ bei 3 Tagen; $90,2 \pm 15,52 \%$ bei 7

Tagen; $115,3 \pm 15,52$ % bei 14 Tagen; $116,3 \pm 20,45$ % bei 28 Tagen und $121,9 \pm 10,9$ % bei 56 Tagen nahezu konstant.

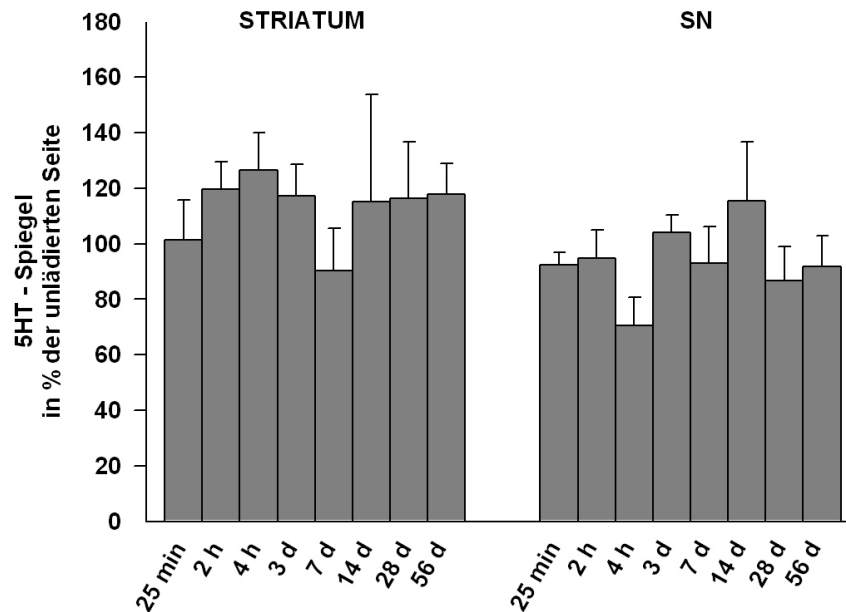


Abb. 3: 6-OHDA induzierte Veränderungen der Gewebekonzentration von 5-HT in Striatum und Substantia nigra nach 25 min., 2 h, 4 h, 3 d, 7 d, 14 d, 28 d und 56 d (n = 4 bis 12 Mäuse pro Gruppe) nach Injektion von 4 µg 6-OHDA ins linke Striatum und einer korrespondierenden Menge NaCl ins rechte Striatum. Dabei wurde der Wert der sham-lädierten Kontrollseite auf 100% gesetzt und der Wert der Läsionsseite jeweils für Striatum und Substantia nigra als prozentualer Anteil davon angegeben (Mittelwert \pm SEM)(*p<0,05).

3.1.4. 6-OHDA-induzierte Hydroxylierungsreaktionen in Striatum und Substantia nigra

6-OHDA induziert Hydroxylierungsreaktionen, d.h. die Bildung freier Radikale, indirekt gemessen an der Zunahme des 2,5-DHBA/Natriumsalicylat-Quotienten. Im Striatum folgte auf die Injektion von 4 µg 6-OHDA eine rapide Zunahme des 2,5-DHBA/Salicylat-Quotienten auf $899 \pm 431,5$ % verglichen mit der sham-lädierten Seite nach 25 Minuten. Dieses Ergebnis erreicht bedingt durch den hohen SEM keine Signifikanz. Nachfolgend blieb der 2,5-DHBA/Salicylat-Spiegel stark

erhöht ($606,4 \pm 167,4$ %, (* $p < 0,05$) 2 Stunden postläsionem und $697,6 \pm 257,6$ %, (* $p < 0,05$) 4 Stunden postläsionem.

Nach 3 Tagen fielen die Werte auf das Ausgangsniveau zurück ($107,4 \pm 5,6$ % am 3. Tag) und blieben stabil bis zum Ende der Messreihe bei $130,8 \pm 24,08$ % bei 7 Tagen; $83,8 \pm 35,85$ % bei 14 Tagen; $154,5 \pm 36,49$ % bei 28 Tagen und $119,5 \pm 6,71$ % am 56. Tag.

Im Bereich der Substantia nigra konnte ebenfalls ein Anstieg des 2,5-DHBA/Natriumsalicylat-Quotienten beobachtet werden, wenn auch weniger ausgeprägt. Der Höchstwert der Messreihe für die SN wurde nach 4 Stunden erreicht ($739,5 \pm 255,9$ %, * $p < 0,05$).

Nach 25 Minuten stieg der Quotient auf $298,9 \pm 178$ % im Vergleich zur kontralateralen Seite und blieb auf diesem Niveau bei 2 Stunden postoperativ ($230,2 \pm 122,8$ %, * $p < 0,05$).

Dem Höchstwert nach 4 Stunden folgte ein Abfall auf das Ausgangsniveau bei 3 Tagen ($100,7 \pm 5,3$ %). Alle folgenden Werte blieben in diesem Bereich stabil ($111,9 \pm 22,41$ % bei 7 Tagen; $107,2 \pm 16,49$ % bei 14 Tagen; $103,8 \pm 19,28$ % bei 28 Tagen und $114,8 \pm 9,71$ % am 56. Tag).

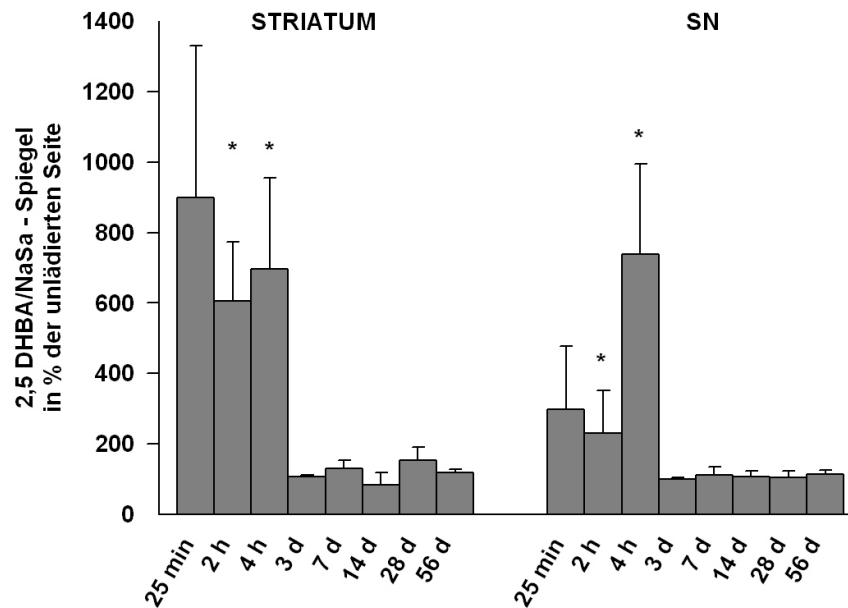


Abb. 4: 6-OHDA induzierte Veränderungen des Quotienten von 2,5-DHBA/Natriumsalicylat als Zeichen der Radikalproduktion in Striatum und Substantia nigra nach 25 min., 2 h, 4 h, 3 d, 7 d, 14 d, 28 d und 56 d (n = 4 bis 12 Mäuse pro Gruppe) nach Injektion von 4 µg 6-OHDA ins linke Striatum und einer korrespondierenden Menge NaCl ins rechte Striatum. Dabei wurde der Wert der sham-lädierten Kontrollseite auf 100% gesetzt und der Wert der Läsionsseite jeweils für Striatum und Substantia nigra als prozentualer Anteil davon angegeben (Mittelwert \pm SEM)(*p<0,05).

3.2. Histologie

3.2.1. Effekte der Läsion auf die Anzahl TH-positiver Neurone in Substantia nigra und VTA

6-OHDA induziert einen langanhaltenden Verlust TH-positiver Neurone des Mittelhirns.

In der Substantia nigra zeigt sich dieser Zelluntergang vor allem innerhalb der ersten 7 Tage.

Nach 3 Tagen blieben noch $65 \pm 4,42\%$ TH-positiver Neurone verglichen zur unlädierten Seite übrig (*p<0,05). Nach 7 Tagen zeigte sich ein weiterer Abfall auf $32,2 \pm 5,4\%$ (*p<0,05). Nachfolgend sank die Zellzahl

nur noch gering von $34,7 \pm 4 \%$ am 14. Tag über $25,3 \pm 3,6 \%$ am 28. Tag zu $17,9 \pm 2,1 \%$ am 56. Tag (* $p < 0,05$) nach Injektion von $4 \mu\text{g}$ 6-OHDA (Abb. 5).

Der Zellverlust nach 3 Tagen erreichte statistische Signifikanz verglichen mit allen späteren Zeitpunkten (# $p < 0,05$). Der nachfolgende leichte Abfall der Zellzahl erreichte hingegen keine statistische Signifikanz.

Auf der sham-lädierten Seite war ein leichter Zellverlust TH-positiver Neurone von $7,1 \pm 3,9 \%$ am 7. Tag und $12,4 \pm 5,9 \%$ am 14. Tag in der SN zu beobachten. Anschließend blieb die Zellzahl im Bereich der Ausgangswerte ($0,4 \pm 4,3 \%$ am 28. und $2,7 \pm 1,5 \%$ am 56. Tag).

In der VTA konnte ebenfalls ein Verlust dopaminerger Neurone beobachtet werden, allerdings weniger ausgeprägt als im Bereich der SN. Nach 3 Tagen zeigte sich ein leichter, aber statistisch signifikanter Abfall der Zellzahl auf $83,2 \pm 2,5 \%$ (* $p < 0,05$). Dieser Zellverlust erreichte statistische Signifikanz verglichen mit allen weiteren Zeitpunkten (# $p < 0,05$).

Nach 7 Tagen postoperativ zeigte sich ein weiterer Zellverlust TH-positiver Neurone auf $56,9 \pm 2,9 \%$ (* $p < 0,05$) am 7. Tag, welcher stabil von $56,3 \pm 4,8 \%$ (* $p < 0,05$) am 14. Tag über $53,5 \pm 3,2 \%$ (* $p < 0,05$) am 28. Tag zu $44 \pm 4,0 \%$ (* $p < 0,05$) am 56. Tag blieb (Abb. 5).

Auf der sham-lädierten Seite im Bereich der VTA war ein Zellverlust ähnlich des Zellverlustes TH-positiver Neurone der sham-lädierten Seite in der SN zu beobachten.

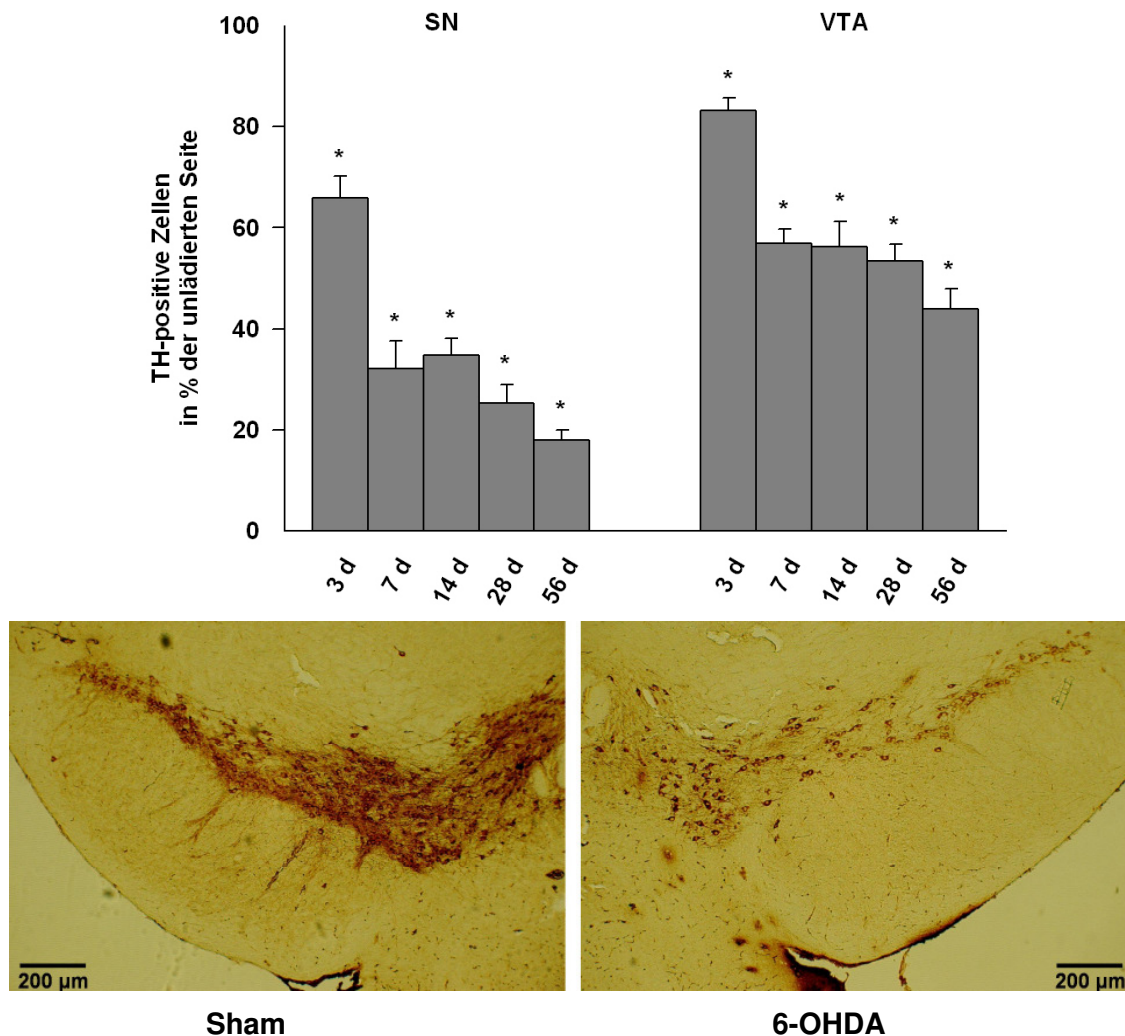


Abb. 5: 6-OHDA induzierte Veränderungen der Zellzahlen TH-positiver Neurone in Substantia nigra und VTA 3, 7, 14, 28 und 56 Tage (n= 4 bis 10 Mäuse pro Gruppe) nach Injektion von 4µg 6-OHDA ins linke Striatum und einer korrespondierenden Menge NaCl ins rechte Striatum. Dabei wurde der Wert der Kontrollseite auf 100% gesetzt und der Wert der Läsionsseite jeweils für SN und VTA als prozentualer Anteil davon angegeben (Mittelwert \pm SEM)(*p<0,05). Die Fotografien zeigen repräsentative TH gefärbte Schnitte der SN von sham bzw. 6-OHDA lädierten Tieren nach 14 Tagen.

3.3. Verhaltenstestung

3.3.1. 6-OHDA induzierte motorische Defizite bei konstanter Rod-Geschwindigkeit

Bei der Verhaltenstestung wurden sowohl unilateral intrastriatal lädierte Mäuse als auch unilateral sham-lädierte Mäuse eingesetzt.

Jede Maus musste 5 Läufe absolvieren. Die jeweils längste Zeit, die auf dem Rotarod verbracht wurde, wurde als Wert berücksichtigt. Nach 300 Sekunden stoppte die Messung automatisch.

Bei konstanter Geschwindigkeit (fixed speed Rotarod, FSRR) von 20 RPM schafften alle sham-lädierten Kontrollmäuse eine Laufzeit von 300 ± 0 Sekunden.

Bei den striatal-lädierten Mäusen zeigten sich ausgeprägte Verhaltensveränderungen, am ausgeprägtesten 3 Tage postläsionem ($13,9 \pm 2,36$ sec, $*p < 0,05$). Nach 7 Tagen war eine leichte Erholung zu beobachten. Die Laufzeit stieg auf $148,9 \pm 28,72$ sec, $*p < 0,05$.

Nach 14 Tagen konnte verglichen zur Kontrollgruppe keine statistische Signifikanz mehr erreicht werden. Die Werte zeigten sich weiter verbessert bei $168,5 \pm 30,77$ sec bei 14 Tagen; $190,3 \pm 39,49$ sec bei 28 Tagen und $220,7 \pm 26,4$ sec bei 56 Tagen (Abb. 6).

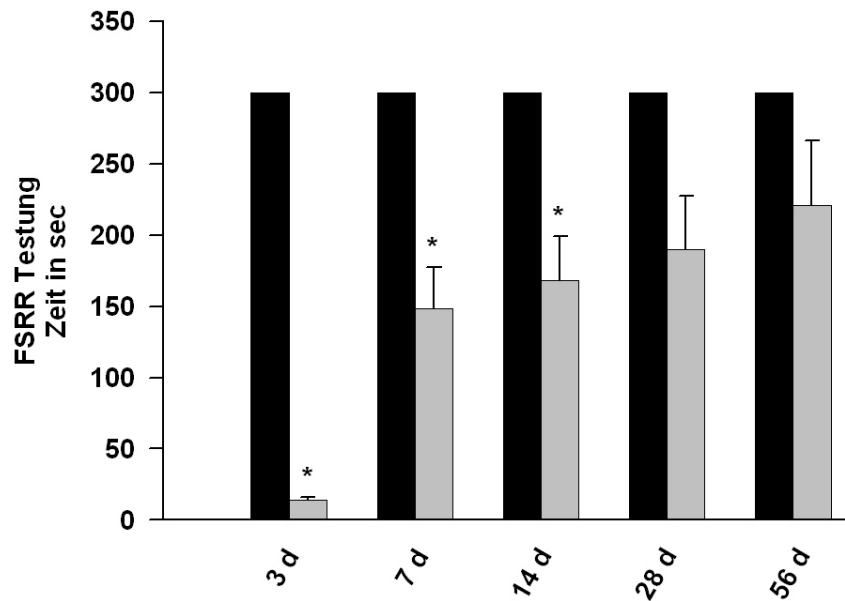


Abb. 6: 6-OHDA induzierte Veränderungen der Aktivität auf dem Rotarod bei konstanter Geschwindigkeit (FSRR) am 3., 7., 14., 28. und 56. Tag (n= 6 bis 9 Mäuse pro Gruppe) nach Injektion von 4 µg 6-OHDA ins linke Striatum (graue Säulen) bzw. einer korrespondierenden Menge NaCl (schwarze Säulen). Die Werte sind angegeben als absolute Zeit, die die Tiere auf dem Stab balancieren konnten (Mittelwert ± SEM)(*p<0,05). Die Messung wurde jeweils nach 300 Sekunden abgebrochen.

3.3.2. 6-OHDA induzierte motorische Defizite bei beschleunigter Rod-Geschwindigkeit

Bei Beschleunigung des Rotarod (Accelerated Rotarod, ARR) von 15 RPM auf 25 RPM innerhalb von 150 Sekunden zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie bei konstanter Laufgeschwindigkeit.

Alle unilateral sham-lädierten Kontrollmäuse schafften in mindestens einem von 5 Läufen eine Laufzeit von 300 ± 0 Sekunden.

Die intrastriatal lädierten Mäuse waren nach 3 Tagen in der Lage sich $19,6 \pm 6,89$ sec, (*p<0,05) auf dem Rotarod zu halten.

Nach 7 Tagen zeigte sich eine Verbesserung auf $127,7 \pm 27,74$ sec, (*p<0,05). Auch nach 14 Tagen wurde im Gegensatz zur konstanten Laufzeit statistische Signifikanz erreicht mit $136,3 \pm 27,78$, (*p<0,05).

Die Werte verbesserten sich stetig leicht bis zum Endpunkt der Messung, erreichten jedoch keine statistische Signifikanz ($171,5 \pm 36,38$ sec am 28. Tag und $237,2 \pm 36,25$ sec am 56. Tag) (Abb. 7).

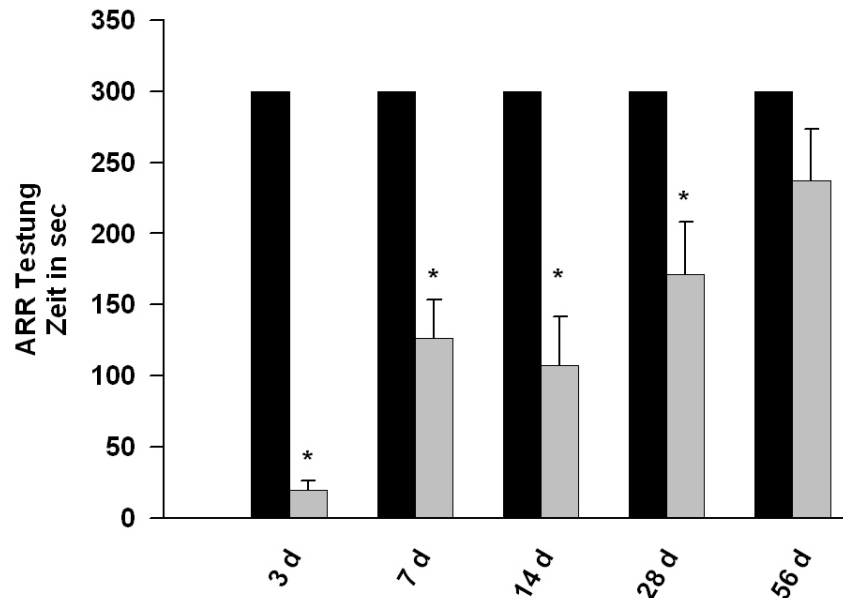


Abb. 7: 6-OHDA induzierte Veränderungen der Aktivität auf dem Rotarod bei Beschleunigung (ARR) von 15 auf 25 RPM in 150 Sekunden am 3., 7., 14., 28. und 56. Tag ($n= 6$ bis 9 Mäuse pro Gruppe) nach Injektion von $4 \mu\text{g}$ 6-OHDA ins linke Striatum (graue Säulen) bzw. einer korrespondierenden Menge NaCl (schwarze Säulen). Die Werte sind angegeben als absolute Zeit, die die Tiere auf dem Stab balancieren konnten (Mittelwert \pm SEM). Die Messung wurde jeweils nach 300 Sekunden abgebrochen.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde detailliert das 6-OHDA-Modell an der Maus nach unilateraler intrastriärer Applikation von 4 µg 6-OHDA hinsichtlich des Zeitverlaufs und des Ausmaßes der Schädigung des nigrostriären Systems unter Berücksichtigung von a) intranigraler und intrastriärer Dopaminkonzentration, b) Radikalentstehung, c) Verlust dopaminerger Zellen in SN und VTA sowie d) das Ausmaß des dadurch induzierten motorischen Defizits an männlichen C57Bl/6-Mäusen untersucht.

Bislang wurde das 6-OHDA-Modell weitgehend nur an Ratten eingesetzt. Für die Forschung könnte aber interessant sein, dieses Modell zunehmend auch an der Maus einzusetzen. Die am besten etablierten und am weitesten verbreiteten Parkinsonmodelle der Maus basieren auf einer Intoxikation mit MPTP. Obwohl diese Modelle einen sehr hohen Stellenwert in der Parkinsonforschung besitzen, weisen sie auch einige Nachteile auf. Das Ausmaß der nigrostriären Schädigung ist abhängig vom Stamm, dem Alter und dem Geschlecht der Mäuse (Sundstrom et al., 1987; Smeyne et al., 2005). Dies kann von entscheidendem Nachteil sein, wenn transgene oder knock-out Tiere untersucht werden, da diese meist verschiedene genetische Hintergründe haben, wie z.B. SV129 oder Swiss, zwei Stämme, die kaum sensibel gegenüber MPTP sind. Nach MPTP-Gabe wurden auch spontane Remissionen der induzierten Schädigung berichtet (Sedelis et al., 2000; Höglinger et al., 2004), was dieses Modell eingeschränkt nutzbar in Studien zu therapeutischen Langzeiteffekten und Neuroprotektionsstudien macht. Schließlich tritt die Schädigung des nigrostriären Systems je nach Injektionsprotokoll schnell und aggressiv auf, im Gegensatz zum vermuteten Verlauf der Parkinsonerkrankung beim Menschen.

Mit dieser Arbeit sollte eine Charakterisierung des 6-OHDA-Modells der Maus – insbesondere die Frage in wie weit das Maus-Modell analog zum Rattenmodell ist - erfolgen.

Zusammenfassend zeigte sich nach intrastriataler Injektion von 6-OHDA ein langanhaltender und stabiler Verlust nigraler dopaminerges Neurone, ein korrespondierender Verlust striataler Dopaminkonzentration sowie eine signifikante Verhaltensbeeinträchtigung, die sich über einen Zeitraum von 2 Monaten leicht rückläufig zeigte. Vorarbeiten zu diesem Projekt zeigten, dass das Ausmaß der Schädigung unabhängig von der Dosierung von 2µg bzw 4µg war. Allerdings war die Variabilität der Schädigung bei 4µg geringer (Alvarez-Fischer et al., 2008).

4.1. Diskussion der Methoden

4.1.1 Diskussion methodischer Aspekte des Modells

Wie alle Behandlungsmodelle birgt auch die Anwendung von 6-OHDA einige mögliche Fehlerquellen. Möglich ist, dass ein Teil der 6-OHDA-Lösung bereits vor der intrastriatalen Injektion oxidiert ist, weil die Lösung nicht ausreichend lichtgeschützt oder zu gering gekühlt aufbewahrt wurde. Eine gute Stabilisierung würde auch durch einen niedrigen pH-Wert erreicht. Allerdings senkt dieser die parenchymale Verträglichkeit und würde selbst zu unspezifischen Nekrosen führen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher analog dem Rattenmodell 0.02 % Ascorbinsäure hinzugefügt, um einer frühzeitigen Oxidation vorzubeugen (Ding et al., 2004). Außerdem wurde die 6-OHDA Lösung für jeden Operationstag frisch hergestellt, aliquotiert und die Aliquots bis zur Verwendung bei -20°C in lichtgeschützten Eppendorf cups aufbewahrt. Ein Aliquot wurde für 3-4 Tiere verwendet und währenddessen unter Lichtschutz auf Eis gelagert.

Eine weitere Fehlerquelle ist eine nicht ausreichende Gewebediffusion des Toxins. Deswegen wurde die Kanüle 5 min nach Ende der Injektion am Injektionsort belassen und so eine ausreichende Diffusion sichergestellt. Ebenso ist eine Gewebeschädigung durch ein zu großes Injektionsvolumen bzw. eine zu rasche Injektion möglich. Hinsichtlich der

Injektionsgeschwindigkeit wurde sich am Rattenmodell orientiert und die Lösung mit einer Geschwindigkeit von 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ injiziert. Das Gesamtvolumen von 2 μl intrastriatal verglichen mit 4 μl bei der Ratte (Sauer und Oertel 1994) ist sicherlich groß, wenn man es mit dem Größenverhältnis der Gehirne vergleicht. Auch wenn dieser Aspekt nicht systematisch untersucht wurde, bleibt festzuhalten, dass es in der makroskopischen Analyse bei der Gewebepräparation zur Aufarbeitung für die HPLC zu keinen Nekrosen gekommen ist. Erfahrungen aus dem Labor zeigen auch auf histologischer Ebene keinen unspezifischen Gewebeschaden, abgesehen vom Injektionskanal.

Ein großer Nachteil der Methodik – gerade im Vergleich zu den MPTP basierten Modellen – ist jedoch, diese Eröffnung des Gehirns mit Verletzung der Hirnhäute und des Hirnparenchyms sowie der möglichen Verschleppung von Keimen bzw. Allergenen. Diese macht dieses Modell für die Erforschung immunologischer Aspekte der Erkrankung praktisch unbrauchbar.

Darüber hinaus besteht bei einer stereotaktischen Operation zudem die Möglichkeit, dass Koordinaten nicht exakt gewählt bzw. in der Operation nicht exakt umgesetzt werden. Die Auswahl der Zielkoordinaten erfolgte nach dem Atlas von Franklin und Paxinos (Franklin und Paxinos, 1996). Zudem bestand im Labor ausreichend Erfahrung mit der stereotaktischen Operation an der Maus. Darüber hinaus stellt dieser Aspekt bei einer relativ großen Struktur wie dem Striatum eher eine untergeordnete Rolle. Ein Nachteil gegenüber den MPTP basierten Modellen ist jedoch, dass eine Narkose durchgeführt werden muss.

4.1.2. Diskussion analytischer Aspekte des Modells

Ein wichtiger Aspekt im 6-OHDA Modell ist die Entstehung von Radikalen (Blum et al., 2001; Cohen und Heikkila 1974; Ungerstadt, 1971), anders als beim MPTP Modell, wo die Hemmung der Atmungskette im Mitochondrium im Vordergrund steht (Schmidt und Ferger, 2001). Dieses bildet zwar die Bedeutung der Radikalentstehung in der Pathogenese der

Parkinsonserkrankung ab (Henze et al., 2005; Jenner et al., 2003; Jenner et al., 2006) stellt aber auch die Frage nach dem Zeitverlauf und der Quantifikation der Radikalentstehung.

Die direkte Messung von Hydroxylradikalen (und Peroxynitrit) ist in biologischen Systemen aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit und hohen Reaktivität schwierig.

Es gibt drei mögliche Verfahren:

1. Die direkte Messung mittels Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (ESR).
2. Die Messung der Reaktionsprodukte von Hydroxylradikalen mit endogenen Substanzen wie beispielsweise die Bestimmung von oxidierten Proteinen, Lipiden oder DNA. Allerdings ist diese Methode relativ ungenau, da auch unter physiologischen Bedingungen ständig Redox-Reaktionen ablaufen.
3. Die Messung der Reaktionsprodukte von Hydroxylradikalen mit exogenen Substanzen wie Salicylsäure durch HPLC (sogenannte HPLC-basierte Salicylat-Hydroxylierungsmethode).

Vorteil der HPLC-basierten Salicylat-Hydroxylierungsmethode ist, dass die Reaktionsprodukte bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von mehreren Stunden und tiefgefroren sogar mehreren Wochen stabil sind (Coudray et al., 1995).

Im hier vorliegenden Modell wurden 6-OHDA-induzierte Hydroxylierungsreaktionen, d.h. die Bildung freier Radikale, indirekt an der Zunahme des 2,5-DHBA/Natriumsalicylat-Quotienten gemessen.

Salicylsäure fängt Radikale unter Bildung von 2,3-DHBA, 2,5-DHBA und Catechol ab. Da 2,5-DHBA auch metabolisch durch Cytochrom P 450 Oxidase gebildet wird, scheint 2,3-DHBA noch geeigneter zur Beurteilung der Radikalbildung zu sein. In dieser Arbeit wurde allein aus technischen Gründen jedoch nur 2,5-DHBA gemessen, wodurch mögliche Ungenauigkeiten entstanden sein könnten.

Obwohl Salicylsäure nur ein relativ schwacher Hemmstoff der Cyclooxygenase ist, weist sie dennoch starke biologische Effekte auf. Ihre analgetischen, antiinflammatorischen und antipyretischen Eigenschaften können zusätzliche Effekte auf die Radikalbildung auslösen und sind bei der Interpretation zu berücksichtigen.

Als ein weiterer methodisch-analytischer Aspekt wurde in der vorliegenden Arbeit der Untergang TH-positiver Zellen als Marker der Degeneration des dopaminergen Systems eingesetzt. Die Umsetzung von Tyrosin zu Dopa durch die TH ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Katecholaminsynthese. Die TH-Färbung entspricht daher nicht nur der Vitalität, sondern auch der grundsätzlichen enzymatischen Fähigkeit der Zelle zur Dopaminsynthese.

Möglich ist, dass schwächer geschädigte Zellen, sogenannte Geisterzellen, nur vorübergehend ihre Tyrosinhydroxylase-Aktivität verloren haben und sich innerhalb der nächsten Tage wieder erholen (Jackson-Lewis et al., 1995). Zum Zeitpunkt der Auswertung werden diese Zellen nicht erfasst. Diesem Fehler kann begegnet werden, indem eine Nissl-Gegenfärbung durchgeführt und die Neuronenzahl quantifiziert wird. Somit ist die TH-Färbung eher ein Marker für die Funktion während die Nissl-Färbung wirklich Zelltod nachweist. So ist eine Nissl-Gegenfärbung beim MPTP-Modell unabdingbar, da ein großer Anteil der Spontanremission vermutlich auf eine Erholung dieser „Geisterzellen“ zurückzuführen ist (Schmidt und Ferger, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde aus folgenden Überlegungen darauf verzichtet:

Zum einen wurde gezeigt, dass es zu keinerlei Remission kommt. Aus dem Rattenmodell ist bekannt, dass die TH-Zellen untergehen und die Entstehung von „Geisterzellen“ nur eine untergeordnete Rolle spielen. Zusammen mit der fehlenden Remission in der Maus lässt dieses den Schluss zu, dass die auch für das Mausmodell gilt. Auf der kontralateralen Seite hingegen kommt es zu einer Spontanremission was am ehesten auf eine vorübergehende subletale Schädigung der Zellen spricht.

Eine Durchführung einer Nissl-Gegenfärbung zum Beweis, dass die sich nachgewiesen sich erholenden Zellen in der Tat nicht tot waren, ist augenfällig überflüssig.

Problematisch könnte neben dem Problem des geeigneten Markers ganz grundsätzlich die mikroskopische Analyse der einzelnen Hirnschnitte sein. Trotz eindeutiger Auszählkriterien (siehe Kapitel 2.7.3) liegen morphologische Unterschiede zwischen den verschiedenen Mäusehirnen vor. Zudem kann eine Ungenauigkeit vorliegen, falls die Schnitte nicht immer exakt auf dem gleichen Niveau liegen und diese eventuell auch nicht identisch symmetrisch geteilt wurden. Um dem vorzubeugen, wurde der Lemniscus medialis als Grenze zwischen SNpc und VTA genommen (siehe auch Lee et al., 1996).

Im Vergleich zweier Tiermodelle zwischen zwei Spezies ist immer die unterschiedliche Anatomie zu berücksichtigen. In diesem Fall sind viele Unterschiede in den Ergebnissen mit den unterschiedlichen Hirngrößen von Mäusen und Ratten zu erklären.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Dosierung von 6-OHDA

Da das 6-OHDA Modell an der Ratte bekannterweise zu einer stabilen einseitigen dopaminergen Denervation führt (Sauer und Oertel, 1994), ist es vor allem für Transplantations- und Neuroprotektionsstudien verwendet worden. In diesem Zusammenhang ist es bereits an der Maus eingesetzt worden (z.B. Nishimura et al., 2003; Akerud et al., 2001; Cunningham und Su, 2002). Bis heute wurde es aber nicht grundlegend charakterisiert. So sind auch in den verschiedenen Studien verschiedene Dosierungen mit erheblichen Unterschieden verwendet worden (4µg bei Nishimura et al., 2003; Akerud et al., 2001), 12µg bei Iwata et al., 2004; 16µg Cunningham und Su, 2002; 20µg Silva et al., 2005 und 30 µg bei Bensadoun et al.,

1998). Ebenso variierte das Injektionsvolumen von 2µl (Nishimura et al., 2003) zu 4µl (Iwata et al., 2004; Silva et al., 2005) und wurde nicht angegeben für Akerud et al., 2001. Eine Zusammenfassung ist in Tabelle 1 dargestellt. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass mit 4 µg eine permanente Depletion des nigro-striatalen Systems erreicht wird und ein Gesamtvolumen von 2µl von den Tieren gut toleriert wird, ohne dass es zu einem wesentlichen unspezifischen Parenchymschaden kommt.

Studie	Dosierung / Volumen	Überleben TH-positiver Zellen im Mittelhirn	Striataler DA-Gehalt
Akerud et al., 2001	4µg / N.A.	61% nach 14d	N.A.
Bensadoun et al., 1998	30µg / 2µl	47.6% nach 7d	65.8% nach 1d 28.8% nach 3d
Cunningham und Su, 2002	16µg / 2µl	14% nach 14d	56% nach 35d (SN) 10% nach 35d (Striatum)
Iwata et al., 2004	12µg / 4µl	100% nach 1d 60% nach 4d 50% nach 14d (TH protein)	73% nach 1d < 30% nach 4d 44.6% nach 14d (TH protein)
Lundblad et al., 2004	2 x 6µg / 2µl ipsilateral	N.A.	30% DA re-uptake sites nach 35d
Nishimura et al., 2003	4µg / 2µl	N.A.	N.A.
Silva et al., 2005	20µg / 4µl	19% nach 28d	N.A.
Tanaka et al., 2006	60µg / 2µl i.c.v.	N.A.	30% nach 3d vollständige Remission nach 28d
Vorliegende Arbeit	4µg / 2µl	65.9% nach 3d 34.7% nach 14d 17.9% nach 56d	21.1% nach 3d 14% nach 14d 7% nach 56d

4.2.2 Abhängigkeit der Toxizität vom genetischen Hintergrund

Genetisch modifizierte Mäuse sind ein interessantes und zunehmend verwendetes Modell, um die Pathophysiologie des Morbus Parkinson zu

untersuchen. Der genetische Hintergrund dieser Tiere basiert nicht immer auf einem C57Bl/6 Hintergrund, was Einschränkungen für MPTP-basierte Modelle bedeutet (Sundstrom et al., 1987; 1990; Smeyne et al., 2005). Auch wenn in der vorliegenden Arbeit die Abhängigkeit der 6-OHDA-Schädigung vom genetischen Hintergrund nicht im Detail untersucht wurde, erscheint es mehr als unwahrscheinlich, dass ähnliche Einschränkungen wie für das MPTP-Modell, nämlich Abhängigkeit von Geschlecht, Alter und genetischem Hintergrund auch für das 6-OHDA Modell gelten, da es offensichtlich nicht einmal eine Speziesabhängigkeit gibt. So wird das Modell nicht nur an der Ratte verwendet und ist in dieser Arbeit an der Maus charakterisiert worden, sondern findet Verwendung ebenso am Affen und an der Katze. In Übereinstimmung damit konnte in dem Labor auch im Anschluss an diese Arbeit gezeigt werden, dass die Charakteristika, die in dieser Arbeit gefunden wurden, in der Tat auch genauso für 2 weitere Mausstämme, den SV129 und Swiss Hintergrund, gelten (Alvarez-Fischer et al., 2008)

4.2.3 Zeitverlauf des nigrostriatalen Schadens

4.2.3.1 Zeitverlauf der Neurotransmitterkonzentration

Um die progrediente Neurodegeneration zu messen, wurden in der vorliegenden Arbeit Dopaminmessungen in Striatum und Substantia nigra vorgenommen als direktes Maß für den Grad der dopaminergen Denervation. Dazu korrelierend wurde der Dopaminumsatz durch Messung des HVA/Dopamin-Quotienten verwendet.

Initial kam es zu einem überraschenden Anstieg der Dopaminkonzentration im Striatum nach 25 Minuten, anhaltend bis 4 Stunden nach Injektion. Möglicherweise ist dieser Anstieg auf einen Kompensationsmechanismus aufgrund des ansteigenden Dopaminumsatzes zurückzuführen. Dann fällt die Dopaminkonzentration progredient ab bis zum 14 Tag postläsionem.

Ähnliche Daten fanden sich bei Tanaka et al. (2006), die allerdings 6-OHDA intrazerebroventrikulär applizierten. Dabei zeigte sich nach 3

Tagen eine striatale Dopaminreduktion auf 25% verglichen zum Ausgangsniveau.

In dieser Arbeit zeigte sich eine Reduktion auf 21,1% nach 3 Tagen. Bei Tanaka et al. (2006) kam es am 28. Tag nach Injektion zu einer Erholung des striatalen Dopamingehaltes, die in der hier vorliegenden Durchführung nicht gesehen wurde. Es zeigte sich im Gegenteil eine progrediente striatale Dopaminreduktion auf 7% der unbehandelten Seite nach 8 Wochen.

Vergleichbare Daten gehen aus der Arbeit von Cunningham und Su hervor, die nach 5 Wochen bei Mäusen eine Abnahme des striatalen Dopamingehaltes von 90% zur Gegenseite beobachteten (Cunningham and Su, 2002).

In der vorliegenden Arbeit steigt der HVA/Dopamin-Quotient als Marker des Dopaminumsatzes bereits nach 25 Minuten sowohl im Striatum als auch in SN an und steigt weiter bis zum 3. Tag bzw. 7. Tag postläsionem, an dem dann ein Plateau bis 8 Wochen postläsionem erreicht wird. Auch Cunningham and Su beobachteten nach 5 Wochen eine erhebliche Steigerung des Dopaminumsatzes (gemessen als HVA/Dopamin-Quotient) (Cunningham and Su, 2002).

Erklärbar ist die gesteigerte Dopaminumsatzrate mit einer erhöhten Synthese in den residualen Neuronen verbunden mit einer erhöhten Transmitterfreisetzung bzw. erhöhten Entladungsrate. Zudem steigt der Spiegel an Dopamin im Extrazellulärraum an, da durch den partiellen Untergang von Nervenendigungen auch hochaffine, selektive Dopaminwiederaufnahmestellen verloren gehen (Zigmond et al., 2002; Schwarting et al., 1991).

Auffallend ist, dass die Gewebekonzentration von 5-HT nahezu unbeeinflusst blieb. Ichitani et al., 1994 fanden nach intrastriataler 6-OHDA-Injektion bei Ratten das serotonerge System ebenfalls

unbeeinflusst und werteten dies als Anhalt für die selektive, spezifische Wirkung von 6-OHDA auf das dopaminerge System (Ichitani et al., 1994).

4.3.2.2 Zeitverlauf des nigralen Zellverlusts

Nach Injektion von 6-OHDA kommt es bereits nach 3 Tagen zu einem signifikantem Zellverlust, der bereits nach weiteren 4 Tagen sein Plateau erreicht. Somit ist der Zeitverlauf des Zellverlusts wesentlich anders als in der Ratte, wo der Zellverlust 1-2 Wochen nach Injektion beginnt und sein Plateau erst nach 4-6 Wochen erreicht (Sauer und Oertel, 1994). Die beste Erklärung für dieses unerwartete Ergebnis liegt am ehesten in der unterschiedlichen Größe der Gehirne von Maus und Ratte. So ist die SN der Maus von der Injektionsstelle etwa halb soweit entfernt wie bei der Ratte (Sauer und Oertel, 1994; Franklin und Paxinos, 1997; Paxinos und Watson, 1982). Auch das Verhältnis von injiziertem Volumen (2µl in dieser Studie verglichen mit 4µl in der Ratte) zur Größe des Striatums ist in der Maus etwa 1,5 – 2 Mal kleiner als in der Ratte. Vergleichbare Werte fanden sich hier bei Iwata et al. (2004), die ebenfalls einen schnelleren Untergang dopaminerger Neurone bei der Maus im Vergleich zur Ratte sahen und dafür die unterschiedliche Länge der Axone verantwortlich machten. Natürlich kann mit den vorliegenden Daten nicht ausgeschlossen werden, dass unterschiedliche axonale Eigenschaften beider Spezies für das Phänomen verantwortlich sind. Dies erscheint aber sehr unwahrscheinlich. Um dies auszuschließen, müsste etwa radioaktiv markiertes 6-OHDA bzw. ein nicht toxischer, retrograd transportierter Stoff striatal injiziert werden. Anschließend könnte per SPECT-Untersuchung die Transportgeschwindigkeit untersucht werden.

Die erzielte neuronale Degeneration hält über 56 Tage an. Bei Ichitani et al., 1994 wurde bei der Ratte ein Verlust TH-reaktiver Zellen bis zu 10 Monate postläsionem beschrieben.

Inwieweit dabei apoptotische Mechanismen eine Rolle spielen, bleibt unklar und weiterhin Gegenstand der Forschung. Einigen Autoren

misslang ein Nachweis für apoptotische Mechanismen wie Jellinger, der keinerlei Anzeichen für programmierten Zelltod in der postmortem Untersuchung der Gehirne IPS-Patienten fand (Jellinger, 2000). Ebenso konnten Jeon et al. nach unilateraler, intranigraler Injektion von 6-OHDA bei Ratten über einen Zeitraum von 60 Tagen keine morphologischen Kriterien von Apoptose erkennen (Jeon et al., 1995)

Es verdichten sich jedoch die Hinweise, dass Apoptose eine Rolle im 6-OHDA-Modell sowie in der Pathogenese der IPS spielt (Hartmann and Hirsch, 2001; He et al., 2000). 6-OHDA scheint zumindest unter in vitro-Bedingungen dopaminerge Neurone durch caspase-abhängige Mechanismen zu zerstören (Ding et al., 2004). Ding et al. konnten an mesenzephalen Kulturen zeigen, dass 6-OHDA Caspase-3 aktiviert und zudem die Wirkung durch einen Caspase-Inhibitor geblockt werden kann.

Der Zellverlust im VTA fällt deutlich geringer aus als in der SN. Ähnliche Befunde sahen auch Yuan et al., 2005, die jedoch keinen progredienten Zellverlust nachweisen konnten, da die Zellzahl nach 2 Wochen keine weitere Abnahme im Vergleich zu späteren Untersuchungszeitpunkten zeigte (Yuan et al., 2005). Die Erklärung dafür liegt am wahrscheinlichsten in der Anatomie der striatalen Afferenzen, denn der proportional höhere Zellverlust in der SN entspricht der topografischen Organisation der dopaminergen Projektion, da die SN hauptsächlich in die Caudatus-Putamen-Region projiziert, wohin das 6-OHDA appliziert wurde, während die Axone der VTA überwiegend ins ventrale Striatum und zu Regionen außerhalb des striatalen Komplexes (Lee et al., 1996) projizieren. Somit erscheint folgerichtig, dass der toxische Effekt in der Struktur am größten ist, die am nächsten zum Injektionsort liegt.

Vor dem Hintergrund des nicht unerheblichen Injektionsolumens verglichen mit dem Volumen des Striatums der Maus stellt sich aber die Frage, ob nicht zumindest zusätzlich die VTA unsensibler gegenüber 6-OHDA und oxidativem Stress zu sein scheint (Ding et al., 2004). Eine mögliche Erklärung ist, dass im VTA erhöhte basale Werte der Katalase

und Gluthation-Peroxidase vorliegen. Daraus resultiert eine höhere Kapazität an Radikalfängern in den Neuronen des VTA, die ROS in größerem Umfang unschädlich machen können (Trepanier et al., 1996).

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich trotz unilateraler Injektion ein bilateraler Zellverlust, wenn auch deutlich ausgeprägter ipsilateral.

Cunningham und Su führen dies auf ein Leck oder teils ungewollte Injektion des Neurotoxins in die Ventrikel zurück (Cunningham and Su, 2002).

Asanuma et al. halten ebenfalls eine mögliche Diffusion durch das Ventrikelsystem für wahrscheinlich (Asanuma et al., 1998). Möglich ist auch eine Schädigung der Kommissurfasern.

Zusammenfassend bleibt jedenfalls festzuhalten, dass 6-OHDA an der Maus zu einem schnelleren und somit weniger chronischem Zellverlust als an der Ratte führt. Dieser Zellverlust ist von erniedrigten striatalen DA-Konzentrationen sowie erhöhtem HVA/DA-Konzentrationen begleitet.

Lundblad et al. (2004) habe bereits gezeigt, dass die Injektion von 6-OHDA in das MFB bzw. das Striatum zu einer lang anhaltenden striatalen Schädigung führt. Zur Bestimmung wurden die striatalen DAT-Spiegel nach 35 Tagen quantifiziert, die nach einer Injektion ins MFB um 88% bzw. nach Injektion ins Striatum um 70% reduziert waren. Somit liegt das Ausmaß des indirekt gemessenem Dopamin-Defizits in der selben Größenordnung wie in der vorliegenden Studie.

Iwata et al. (2004) untersuchten die TH-Proteinspiegel im Mittelhirn und Striatum allerdings nach intra-nigraler Injektion von 6-OHDA. In der Studie werden im Striatum Verluste von 37% nach einem Tag bis maximal 70% nach vier Tagen berichtet. Nach 14 Tagen liegt der Verlust bei 45%. Somit scheint das Striatum selbst über Kompensationsmechanismen zu verfügen, entweder durch das Auswachsen von nicht geschädigten Fasern oder aber durch eine intra-striatale Expression von TH, die im Menschen und am Affen, nicht jedoch an der Maus beschrieben ist (Tandé et al., 2006; Huot und Parent, 2007). In der SN nämlich führte die Injektion

wie in der vorliegenden Studie zu einem Verlust von 50-60% nach 14 Tagen. Nigrale oder striatale Dopaminspiegel wurden nicht gemessen, ebenso wenig wie motorische Beeinträchtigungen.

4.2.4 Zeitverlauf der Radikalentstehung

Im Striatum, in welches 6-OHDA injiziert wurde, zeigt sich das Maximum der Radikalentstehung (gemessen am 2,5-DHBA/Salicylat-Quotienten) bereits 25 Minuten nach Injektion. Die Werte bleiben auf hohem Niveau bis zu 4 Stunden postoperativ stabil und sinken bis zum 3. Tag nach Injektion.

Ursächlich für die Radikalentstehung ist wahrscheinlich die 6-OHDA-Autooxidation, die zur Entstehung von ROS führt.

Die Toxizität des Dopamins bzw. 6-OHDA erklärt sich durch drei Hauptmechanismen (Blum et al., 2001):

1. Entstehung von ROS durch Autooxidation von 6-OHDA
2. Entstehung von H_2O_2 durch enzymatischen Abbau von 6-OHDA (MAO)
3. Hemmung der mitochondrialen Atmungskette

Im Bereich der SN zeigt sich das Maximum der Radikalproduktion deutlich später: im Bereich von 4 Stunden nach Injektion. Dieser Zeitpunkt liegt deutlich früher als bei der Ratte, wo es erst nach sieben Tagen zu einem intranigralen Radikalanstieg kommt (Henze et al., 2005). Aber auch schon zu früheren Zeitpunkten zeigt sich ein intranigraler Radikalanstieg in der Maus. Dieses Ergebnis unterstützt die unter 4.2.3 aufgestellte Vermutung, dass unterschiedliche Gehirngröße und ein ungünstigeres Verhältnis von Injektionsvolumen zu Gewebegröße vorliegen, denn die nigralen Effekte auf die Radikalentstehung sind am ehesten auf eine 6-OHDA-Autooxidation von direkt diffundiertem und nicht transportiertem Toxin zurückzuführen. In der Ratte jedoch scheint die intra-nigrale Radikalentstehung nicht auf die 6-OHDA-Autooxidation zurückzuführen zu sein, das nach sieben Tagen bereits metabolisiert ist. Dies bedeutet, dass in der Ratte die Bildung freier Radikale in der SN unabhängig vom 6-

OHDA- bzw. Dopaminmetabolismus ist. Möglich ist, dass hier bereits neuronale Degeneration in der SN beginnt.

Sauer und Oertel haben die Theorie aufgestellt, dass die intrastriatale 6-OHDA-Läsion zu einer Art chemikalischer Axotomie führt, welche die neuronalen Zellkörper von ihren Zielstrukturen durch rapide Zerstörung ihrer Nervenendigungen isoliert (Sauer und Oertel, 1994). Dies führt zur verspäteten Degeneration dieser Neurone.

4.2.3. Verhaltensanalyse

Das Rotarod misst im Gegensatz zur lokomotorischen Aktivität beispielsweise nicht die Störung in der freiwilligen Bewegungsausführung, sondern die motorische Koordination. Dieses Modell der Verhaltenstestung ist allgemein gebräuchlich und etabliert (Rozas et al., 1998) und weist neben dem sogenannten Amphetamin-induzierten Rotationstest und dem Zylindertest die höchste Sensitivität im Aufdecken von Verhaltensdefiziten bedingt durch den Verlust von TH-Zellen auf (Iancu et al., 2004).

Ein Vorteil des Rotarod ist, dass die Durchführung keine weitere Applikation von Medikamenten wie beispielsweise Amphetamin zum Auslösen eines rotatorischen Verhaltens im Rotationstest benötigt (Rozas et al., 1997).

Ebenfalls vorteilhaft ist der mögliche Einsatz des Rotarod sowohl bei unilateral lädierten Tieren wie auch bilateral geschädigten Tieren wie beispielsweise nach intraperitonealer MPTP-Injektion (Rozas et al., 1998). Für die Versuchsdurchführung wurde eine so genannte Rattenspindel mit größerem Durchmesser (in diesem Fall 7,3 cm im Gegensatz zu 2,3 cm bei einer Mäusespindel) eingesetzt. In der Literatur zeigte sich ebenso wie in eigenen Vorversuchen, dass kleinere Durchmesser es den Mäusen ermöglichen sich mit dem Stab zu drehen (Rozas et al., 1998).

Weiterhin war aus Vorversuchen ersichtlich, dass eine angemessen hohe Grundgeschwindigkeit benutzt werden musste, damit die Versuchstiere

auf dem Rotarod laufen. Bei Geschwindigkeiten unter 15 RPM zeigten sich gesunde Mäuse leicht ablenkbar, weil es den Tieren keine Mühe bereitete, auf der Spindel zu balancieren. Bei einer Grundgeschwindigkeit von 20 RPM hielten sich alle Mäuse im Rahmen ihrer Möglichkeiten auf dem Rod. Diese Geschwindigkeit erscheint angemessen, gesunde Mäuse entsprechend zu fordern und Verhaltensbeeinträchtigungen kranker Tiere aufzudecken. Rozas et. al empfehlen beispielsweise eine Geschwindigkeit zwischen 16 und 26 RPM bei Mäusen unter Einsatz einer Rattenspindel (Rozas et al., 1998).

Neben einer konstanten Laufgeschwindigkeit wurde ein Beschleunigungsmodus eingesetzt, in der vorliegenden Arbeit eine Beschleunigung von 15 auf 25 RPM in 150 Sekunden. Man geht davon aus, dass Defizite der Bewegungskoordination dadurch stärker hervorgehoben werden (Rozas et al., 1998). Zudem zeichnet sich die Parkinson-Symptomatik aber vor allem durch Schwierigkeiten bei der Bewegungsinitialisierung und -änderung aus, die dadurch besser imitiert werden.

Allerdings kommt es immer wieder zu widersprüchlichen Befunden (Sedelis et al., 2000), die sich vor allem durch Variationen im Durchmesser des Drehstabs, der Zahl der Trainingseinheiten und der Drehgeschwindigkeit ergeben.

Die Testergebnisse zeigen signifikante Verhaltensdefizite nach 3 und 7 Tagen bei konstanter Laufgeschwindigkeit und nach 3, 7 und 14 Tagen bei Beschleunigung. Nach 28 Tagen zeigen sich die Tiere bereits partiell erholt.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit serotonergen Antidepressiva wie beispielsweise Trazodon die Verhaltenstestung positiv beeinflussen kann (Mizoguchi et al., 2002; Morimoto and Kito; 1994). Es scheint dennoch unwahrscheinlich, dass die partielle Erholung in der Verhaltenstestung mittels Rotarod auf

Kompensationsmechanismen durch das serotonerge System zurückzuführen ist, da die striatale Konzentration von 5-HT durch 6-OHDA nicht beeinflusst wurde.

Monville et al. berichteten ebenfalls über eine leichte Besserung motorischer Defizite an Ratten nach intrastriataler 6-OHDA Injektion (Monville et al., 2006). Der Vergleich der Verhaltensbeeinträchtigung zwischen Mäusen und Ratten scheint jedoch erschwert, da allem Anschein nach Mäuse ein vereinfachtes Verhaltensrepertoire im Vergleich zur Ratte haben (Wishaw et al., 2001).

Es zeigte sich keine negative Korrelation mit der Anzahl TH-positiver Zellen in der SN über einen Zeitraum von 12 Wochen wie bei Iancu et al. berichtet (Iancu et al., 2005). In dieser Studie wurde 6-OHDA ins MFB injiziert. Wie bereits erwähnt soll hierdurch eine Dopamindepletion im medialen und lateralen Striatum ausgelöst werden (Lundblad et al., 2004). Die unterschiedliche Erholungskapazität ist daher eventuell auf die unterschiedlichen Schädigungsmuster zurückzuführen.

Unwahrscheinlich ist auch, dass die partielle Erholung auf neues Aussprossen (sogenanntes „Sprouting“) dopaminerger Axone zurückzuführen ist, da sich keinerlei Anstieg der Dopaminkonzentration in diesem Zeitraum zeigt.

Nach Bezard et al. (2003) könnten auch eine Reihe anderer Kompensationsmechanismen in der präsymptomatischen Phase des IPS eine Rolle spielen. Diese Mechanismen sind striatale D₂-Rezeptor-Aufregulierung, striatale Enkephalin-Aufregulierung, ein Anstieg der elektrophysiologischen Aktivität des STN und GPi sowie eine Änderung der Aktivität in zerebellären und thalamischen Kerngebieten.

Als Fazit ist zu ziehen, dass die vorliegende Arbeit das intra-striatale 6-OHDA Modell der Maus auf mehreren Ebenen charakterisiert und validiert. Es erscheint gut geeignet und attraktiv in Kombination mit transgenen und

knock-out Tieren, da eine Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund anders als bei MPTP basierten Modellen sehr unwahrscheinlich ist. Da es zu einer lang anhaltenden und stabilen Neurodegeneration führt, ist es gut geeignet für jede Form von Langzeitstudien, auch wenn es zu einer Erholung auf der Ebene der motorischen Beeinträchtigung kommt. Als Nachteil erweist sich, dass in der Maus auch dieses Modell zu einer relativ raschen Neurodegeneration führt, anders als der Verlauf der humanen Erkrankung und anders als im 6-OHDA Rattenmodell. Zum einen wäre interessant zu untersuchen, warum dieses Modell in der Maus zu einer so raschen Degeneration im Vergleich zur Ratte führt. Dafür wurden in der vorliegenden Arbeit allerdings mehrere plausible Gründe diskutiert. Noch interessanter wäre es aber, zu untersuchen, warum es trotz stabilen nigro-striatalen Defizits zu einer Erholung hinsichtlich des motorischen Defizits kommt, da dies eventuell therapeutische Komplikationen hätte. Auch hierfür wurden Hypothesen entwickelt, die allerdings bisher experimentell ungeklärt bleiben.

5. Zusammenfassung

Das IPS ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung des Menschen verursacht durch einen Untergang dopaminerger Neurone in der Substantia nigra und nachfolgendem konsekutivem Dopaminmangel im Striatum bislang unbekannter Genese. Daraus resultieren die charakteristischen motorischen Symptome des IPS: Akinese, Rigor und Ruhetremor.

Die am häufigsten verwendeten Tiermodelle der Parkinson-Forschung sind das MPTP- und das 6-OHDA-Modell.

6-OHDA führt nach intrastriataler Gabe zu einer partiellen Zerstörung der dopaminergen Nervenendigungen und dadurch zu einem verzögertem und progressiven Verlust dopaminerger Neurone in der Substantia nigra. 6-OHDA wurde bislang weitestgehend nur an Ratten angewendet. Das Interesse, Mäuse als Versuchstiere zu verwenden, wächst stetig, da es ermöglicht, auch genetisch-modifizierte Tiere einsetzen zu können.

In dieser Arbeit wurde das 6-OHDA-Modell der Maus im Zeitverlauf über 8 Wochen unter Berücksichtigung von dopaminergem Zellverlust, Dopaminkonzentration, Radikalentstehung als Marker für oxidativen Stress sowie Verhaltensbeeinträchtigungen charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass 6-OHDA nach intrastriataler Gabe zu einem langanhaltenden Schaden der nigro-striatalen Bahn mit anhaltendem Zellverlust in der Substantia nigra und Dopaminentleerung in Striatum und Substantia nigra über einen Zeitraum von 8 Wochen führt. Zudem konnte ein Anstieg der Radikalbildung, wahrscheinlich einer der Hauptfaktoren in der Pathogenese des IPS, in Striatum und Substantia nigra nachgewiesen werden. Dazu korrelierend zeigte sich eine Verhaltensbeeinträchtigung, die jedoch über einen Zeitraum von 8 Wochen leicht rückläufig war.

Im Vergleich zum Rattenmodell tritt die neuronale Degeneration früher auf und scheint weniger lang anhaltend. Dadurch wird der Zeitverlauf des nigro-striatalen Schadens im Vergleich zum humanen IPS schlechter wiedergegeben.

Dennoch scheint eine weitere Verwendung des 6-OHDA-Mausmodells in Zukunft durch die mögliche Kombination mit transgenetischen oder knock-out Mäusen ein sinnvoller Baustein der Parkinson-Forschung zu sein.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

5-HT	Serotonin
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
ATP	Adenosintriphosphat
CO	Kohlenmonoxid
COMT	Catachol-O-Methyltransferase
DA	Dopamin
DAT	Dopamintransporter
DHBA	Dihydroxybenzoesäure
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure
GABA	γ -Aminobuttersäure
GDNF	Glial cell line derived neurotrophic factor
GPe	Globus pallidus externus
GPi	Globus pallidus internus
GSH	Reduzierte Form des Glutathions
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
HVA	Homovanillinmandelsäure
IL	Interleukin
IPS	Idiopathisches Parkinson-Syndrom
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
L-Dopa	L-Dihydroxyphenylalanin
MAO	Monoaminoxidase
MFB	Mediales Vorderhirnbündel
MPDP ⁺	1-Methy-4-phenyl-2,3-dihydropyridiniumion
MPP ⁺	1-Methyl-4-phenylpyridiniumion
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin

MT	3-Methoxytyramin
NaCl	Kochsalz
NFKB	Nuclear factor kappa B
NHS	Normal horse serum
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
NST	Nucleus subthalamicus
$O_2^{\cdot-}$	Superoxidanionenradikal
$\cdot OH$	Hydroxylradikal
OH^-	Hydroxylanion
$ONOO^-$	Peroxynitrit
PBS	Phosphate buffered saline
RNS	Reaktive Stickstoffstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPM	Rotations per minute
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean)
SN	Substantia nigra
SNpc	Substantia nigra pars compacta
SNpr	Substantia nigra pars reticularis
SOD	Superoxiddismutase
SQ^{\cdot}	Semichinonradikal
TH	Tyrosinhydroxylase
TNF	Tumornekrosefaktor
UPS	Ubiquitin-Proteasomen-System
VMAT	Vesikulärer Monoamintransporter
VTA	Ventrales Tegmentum

Literaturverzeichnis

1. Adams, J.D., Jr.; Odunze, I.N.: Oxygen Free Radicals and Parkinson`s Disease. *Free Radic.Biol:Med.*: 10(2): 161-169, 1991
2. Agid, Y.: Parkinson's Disease: Pathophysiology. *Lancet*: 337(8753): 1321-1324; 1991
3. Akerud, P.; Canals, J.M.; Snyder, E.Y.; Arenas, E.: Neuroprotection Through Delivery of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor by Neural Stem Cells in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *J.Neurosci.*: 21(20): 8108-8118; 2001
4. Alam, Z.I.; Jenner, A.; Daniel, S.E.; Lees, A.J.; Cairns, N.; Marsden, C.D.; Jenner, P.; Halliwell, B.: Oxidative DNA Damage in the Parkinsonian Brain: an Apparent Selective Increase in 8-Hydroxyguanine Levels in Substantia Nigra. *J.Neurochem.*: 69(3): 1196-1203; 1997
5. Alam, Z.I.; Daniel, S.E.; Lees, A.J.; Marsden, D.C.; Jenner, P.; Halliwell, B.: A Generalised Increase in Protein Carbonyls in the Brain in Parkinson's but Not Incidental Lewy Body Disease. *J.Neurochem.*: 69(3): 1326-1329; 1997
6. Alvarez-Fischer, D.; Henze, C.; Strenzke, C.; Westrich, J.; Ferger, B.; Hoglinger, G.U.; Oertel, W.H.; Hartmann, A.: Characterization of the Striatal 6-OHDA Model of Parkinson's Disease in Wild Type and Alpha-Synuclein-Deleted Mice. *Exp.Neurol.*: 210(1): 182-193; 2008
7. Andersen, J.K.: Oxidative Stress in Neurodegeneration: Cause or Consequence? *Nat.Med.*: 10 Suppl: S18-S25; 2004
8. Asanuma, M.; Hirata, H.; Cadet, J.L.: Attenuation of 6-Hydroxydopamine-Induced Dopaminergic Nigrostriatal Lesions in

- Superoxide Dismutase Transgenic Mice. *Neuroscience*: 85(3): 907-917; 1998
9. Bähr, M.; Frotscher, M.: *Duus` Neurologisch-Topische Diagnostik*. 2003
 10. Beal, M.F.; Hyman, B.T.; Koroshetz, W.: Do Defects in Mitochondrial Energy Metabolism Underlie the Pathology of Neurodegenerative Diseases? *Trends Neurosci.*: 16(4): 125-131; 1993
 11. Beal, M.F.: Experimental Models of Parkinson's Disease. *Nat.Rev.Neurosci.*: 2(5): 325-334; 2001
 12. Beckman, J.S.; Beckman, T.W.; Chen, J.; Marshall, P.A.; Freeman, B.A.: Apparent Hydroxyl Radical Production by Peroxynitrite: Implications for Endothelial Injury From Nitric Oxide and Superoxide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*: 87(4): 1620-1624; 1990
 13. Beckman, J.S.; Koppenol, W.H.: Nitric Oxide, Superoxide, and Peroxynitrite: the Good, the Bad, and Ugly. *Am.J.Physiol*: 271(5 Pt 1): C1424-C1437; 1996
 14. Ben Shachar, D.; Eshel, G.; Finberg, J.P.; Youdim, M.B.: The Iron Chelator Desferrioxamine (Desferal) Retards 6-Hydroxydopamine-Induced Degeneration of Nigrostriatal Dopamine Neurons. *J.Neurochem.*: 56(4): 1441-1444; 1991
 15. Ben Shachar, D.; Zuk, R.; Glinka, Y.: Dopamine Neurotoxicity: Inhibition of Mitochondrial Respiration. *J.Neurochem.*: 64(2): 718-723; 1995
 16. Bensadoun, J.C.; Mirochnitchenko, O.; Inouye, M.; Aebischer, P.; Zurn, A.D.: Attenuation of 6-OHDA-Induced Neurotoxicity in Glutathione Peroxidase Transgenic Mice. *Eur.J.Neurosci.*: 10(10): 3231-3236; 1998

17. Bensadoun, J.C.; Deglon, N.; Tseng, J.L.; Ridet, J.L.; Zurn, A.D.; Aebischer, P.: Lentiviral Vectors As a Gene Delivery System in the Mouse Midbrain: Cellular and Behavioral Improvements in a 6-OHDA Model of Parkinson's Disease Using GDNF. *Exp.Neurol.*: 164(1): 15-24; 2000
18. Berg, D.; Youdim, M.B.; Riederer, P.: Redox Imbalance. *Cell Tissue Res.*: 318(1): 201-213; 2004
19. Berg, D.; Hochstrasser, H.: Iron Metabolism in Parkinsonian Syndromes. *Mov Disord.*: 21(9): 1299-1310; 2006
20. Berlit, P.: *Klinische Neurologie*. 2006
21. Betarbet, R.; Sherer, T.B.; Greenamyre, J.T.: Animal Models of Parkinson's Disease. *Bioessays*: 24(4): 308-318; 2002
22. Bezard, E.; Gross, C.E.; Fournier, M.C.; Dovero, S.; Bloch, B.; Jaber, M.: Absence of MPTP-Induced Neuronal Death in Mice Lacking the Dopamine Transporter. *Exp.Neurol.*: 155(2): 268-273; 1999
23. Bezard, E.; Gross, C.E.; Brotchie, J.M.: Presymptomatic Compensation in Parkinson's Disease Is Not Dopamine-Mediated. *Trends Neurosci.*: 26(4): 215-221; 2003
24. Blum, D.; Torch, S.; Nissou, M.F.; Benabid, A.L.; Verna, J.M.: Extracellular Toxicity of 6-Hydroxydopamine on PC12 Cells. *Neurosci.Lett.*: 283(3): 193-196; 2000
25. Blum, D.; Torch, S.; Lambeng, N.; Nissou, M.; Benabid, A.L.; Sadoul, R.; Verna, J.M.: Molecular Pathways Involved in the Neurotoxicity of 6-OHDA, Dopamine and MPTP: Contribution to the Apoptotic Theory in Parkinson's Disease. *Prog.Neurobiol.*: 65(2): 135-172; 2001

26. Ceballos, I.; Lafon, M.; Javoy-Agid, F.; Hirsch, E.; Nicole, A.; Sinet, P.M.; Agid, Y.: Superoxide Dismutase and Parkinson's Disease. *Lancet*: 335(8696): 1035-1036; 1990
27. Cenci, M.A.; Whishaw, I.Q.; Schallert, T.: Animal Models of Neurological Deficits: How Relevant Is the Rat? *Nat.Rev.Neurosci.*: 3(7): 574-579; 2002
28. Chiba, K.; Trevor, A.J.; Castagnoli, N., Jr.: Active Uptake of MPP+, a Metabolite of MPTP, by Brain Synaptosomes. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*: 128(3): 1228-1232; 1985
29. Choi, W.S.; Yoon, S.Y.; Oh, T.H.; Choi, E.J.; O'Malley, K.L.; Oh, Y.J.: Two Distinct Mechanisms Are Involved in 6-Hydroxydopamine- and MPP+-Induced Dopaminergic Neuronal Cell Death: Role of Caspases, ROS, and JNK. *J.Neurosci.Res.*: 57(1): 86-94; 1999
30. Cohen, G.; Heikkila, R.E.: The Generation of Hydrogen Peroxide, Superoxide Radical, and Hydroxyl Radical by 6-Hydroxydopamine, Dialuric Acid, and Related Cytotoxic Agents. *J.Biol.Chem.*: 249(8): 2447-2452; 1974
31. Coudray, C.; Talla, M.; Martin, S.; Fatome, M.; Favier, A.: High-Performance Liquid Chromatography-Electrochemical Determination of Salicylate Hydroxylation Products As an in Vivo Marker of Oxidative Stress. *Anal.Biochem.*: 227(1): 101-111; 1995
32. Cummings, J.L.: Understanding Parkinson Disease. *JAMA*: 281(4): 376-378; 1999
33. Cunningham, L.A.; Su, C.: Astrocyte Delivery of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *Exp.Neurol.*: 174(2): 230-242; 2002
34. de Rijk, M.C.; Launer, L.J.; Berger, K.; Breteler, M.M.; Dartigues, J.F.; Baldereschi, M.; Fratiglioni, L.; Lobo, A.; Martinez-Lage, J.;

- Trenkwalder, C.; Hofman, A.: Prevalence of Parkinson's Disease in Europe: A Collaborative Study of Population-Based Cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology*: 54(11 Suppl 5): S21-S23; 2000
35. Dexter, D.T.; Wells, F.R.; Lees, A.J.; Agid, F.; Agid, Y.; Jenner, P.; Marsden, C.D.: Increased Nigral Iron Content and Alterations in Other Metal Ions Occurring in Brain in Parkinson's Disease. *J.Neurochem.*: 52(6): 1830-1836; 1989
36. Dexter, D.T.; Holley, A.E.; Flitter, W.D.; Slater, T.F.; Wells, F.R.; Daniel, S.E.; Lees, A.J.; Jenner, P.; Marsden, C.D.: Increased Levels of Lipid Hydroperoxides in the Parkinsonian Substantia Nigra: an HPLC and ESR Study. *Mov Disord.*: 9(1): 92-97; 1994
37. Ding, Y.M.; Jaumotte, J.D.; Signore, A.P.; Zigmond, M.J.: Effects of 6-Hydroxydopamine on Primary Cultures of Substantia Nigra: Specific Damage to Dopamine Neurons and the Impact of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor. *J.Neurochem.*: 89(3): 776-787; 2004
38. Dodel, R.C.; Singer, M.; Kohne-Volland, R.; Selzer, R.; Scholz, W.; Rathay, B.; Oertel, W.H.: [Cost of Illness in Parkinson Disease. A Retrospective 3-Month Analysis of Direct Costs]. *Nervenarzt*: 68(12): 978-984; 1997
39. Ehringer, H.; Hornykiewicz, O.: [Distribution of Noradrenaline and Dopamine (3-Hydroxytyramine) in the Human Brain and Their Behavior in Diseases of the Extrapyramidal System.]. *Klin.Wochenschr.*: 38: 1236-1239; 1960
40. Eidelberg, E.; Brooks, B.A.; Morgan, W.W.; Walden, J.G.; Kokemoor, R.H.: Variability and Functional Recovery in the N-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine Model of Parkinsonism in Monkeys. *Neuroscience*: 18(4): 817-822; 1986

41. Elbaz, A.; Clavel, J.; Rathouz, P.J.; Moisan, F.; Galanaud, J.P.; Delemotte, B.; Alperovitch, A.; Tzourio, C.: Professional Exposure to Pesticides and Parkinson Disease. *Ann.Neurol.*: 66(4): 494-504; 2009
42. Fahn, S.; Cohen, G.: The Oxidant Stress Hypothesis in Parkinson's Disease: Evidence Supporting It. *Ann.Neurol.*: 32(6): 804-812; 1992
43. Fahn, S.; Przedborski, S.: Parkinsonism in Merritt`s Neurology. 10th edition: 679-693; 2000
44. Fearnley, J.M.; Lees, A.J.: Ageing and Parkinson's Disease: Substantia Nigra Regional Selectivity. *Brain*: 114 (Pt 5): 2283-2301; 1991
45. Ferger, B.; Themann, C.; Rose, S.; Halliwell, B.; Jenner, P.: 6-Hydroxydopamine Increases the Hydroxylation and Nitration of Phenylalanine in Vivo: Implication of Peroxynitrite Formation. *J.Neurochem.*: 78(3): 509-514; 2001
46. Foley, P.; Riederer, P.: Influence of Neurotoxins and Oxidative Stress on the Onset and Progression of Parkinson's Disease. *J.Neurol.*: 247 Suppl 2: II82-II94; 2000
47. Forno, L.S.; Langston, J.W.; DeLanney, L.E.; Irwin, I.: An Electron Microscopic Study of MPTP-Induced Inclusion Bodies in an Old Monkey. *Brain Res.*: 448(1): 150-157; 1988
48. Franklin, K.B.J.; Paxinos, G.: The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 1997
49. Gasser, T.: Genetics of Parkinson's Disease. *Curr.Opin.Neurol.*: 18(4): 363-369; 2005
50. Gasser, T.: Update on the Genetics of Parkinson's Disease. *Mov Disord.*: 22 Suppl 17: S343-S350; 2007

51. Giasson, B.I.; Jakes, R.; Goedert, M.; Duda, J.E.; Leight, S.; Trojanowski, J.Q.; Lee, V.M.: A Panel of Epitope-Specific Antibodies Detects Protein Domains Distributed Throughout Human Alpha-Synuclein in Lewy Bodies of Parkinson's Disease. *J.Neurosci.Res.*: 59(4): 528-533; 2000
52. Giasson, B.I.; Lee, V.M.: Are Ubiquitination Pathways Central to Parkinson's Disease? *Cell*: 114(1): 1-8; 2003
53. Glinka, Y.; Tipton, K.F.; Youdim, M.B.: Nature of Inhibition of Mitochondrial Respiratory Complex I by 6-Hydroxydopamine. *J.Neurochem.*: 66(5): 2004-2010; 1996
54. Glinka, Y.; Gassen, M.; Youdim, M.B.: Mechanism of 6-Hydroxydopamine Neurotoxicity. *J.Neural Transm.Suppl*: 50: 55-66; 1997
55. Glinka, Y.; Tipton, K.F.; Youdim, M.B.: Mechanism of Inhibition of Mitochondrial Respiratory Complex I by 6-Hydroxydopamine and Its Prevention by Desferrioxamine. *Eur.J.Pharmacol.*: 351(1): 121-129; 1998
56. Goedert, M.; Spillantini, M.G.; Davies, S.W.: Filamentous Nerve Cell Inclusions in Neurodegenerative Diseases. *Curr.Opin.Neurobiol.*: 8(5): 619-632; 1998
57. Greenacre, S.A.; Ischiropoulos, H.: Tyrosine Nitration: Localisation, Quantification, Consequences for Protein Function and Signal Transduction. *Free Radic.Res.*: 34(6): 541-581; 2001
58. Hanrott, K.; Gudmunsen, L.; O'Neill, M.J.; Wonnacott, S.: 6-Hydroxydopamine-Induced Apoptosis Is Mediated Via Extracellular Auto-Oxidation and Caspase 3-Dependent Activation of Protein Kinase Cdelta. *J.Biol.Chem.*: 281(9): 5373-5382; 2006

59. Hartmann, A.; Hirsch, E.C.: Parkinson's Disease. The Apoptosis Hypothesis Revisited. *Adv.Neurol.*: 86: 143-153; 2001
60. He, Y.; Thong, P.S.; Lee, T.; Leong, S.K.; Shi, C.Y.; Wong, P.T.; Yuan, S.Y.; Watt, F.: Increased Iron in the Substantia Nigra of 6-OHDA Induced Parkinsonian Rats: a Nuclear Microscopy Study. *Brain Res.*: 735(1): 149-153; 1996
61. He, Y.; Lee, T.; Leong, S.K.: 6-Hydroxydopamine Induced Apoptosis of Dopaminergic Cells in the Rat Substantia Nigra. *Brain Res.*: 858(1): 163-166; 2000
62. Hefti, F.; Melamed, E.; Sahakian, B.J.; Wurtman, R.J.: Circling Behavior in Rats With Partial, Unilateral Nigro-Striatal Lesions: Effect of Amphetamine, Apomorphine, and DOPA. *Pharmacol.Biochem.Behav.*: 12(2): 185-188; 1980
63. Heikkila, R.E.; Manzino, L.; Cabbat, F.S.; Duvoisin, R.C.: Protection Against the Dopaminergic Neurotoxicity of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,5,6-Tetrahydropyridine by Monoamine Oxidase Inhibitors. *Nature*: 311(5985): 467-469; 1984
64. Henze, C.; Earl, C.; Sautter, J.; Schmidt, N.; Themann, C.; Hartmann, A.; Oertel, W.H.: Reactive Oxidative and Nitrogen Species in the Nigrostriatal System Following Striatal 6-Hydroxydopamine Lesion in Rats. *Brain Res.*: 1052(1): 97-104; 2005
65. Hirsch, E.C.; Hunot, S.; Damier, P.; Faucheux, B.: Glial Cells and Inflammation in Parkinson's Disease: a Role in Neurodegeneration? *Ann.Neurol.*: 44(3 Suppl 1): S115-S120; 1998
66. Hirsch, E.C.: Altered Regulation of Iron Transport and Storage in Parkinson's Disease. *J.Neural Transm.Suppl.*(71): 201-204; 2006

67. Hirsch, E.C.; Hunot, S.: Neuroinflammation in Parkinson's Disease: a Target for Neuroprotection? *Lancet Neurol.*: 8(4): 382-397; 2009
68. Hirsch, E.C.: Iron Transport in Parkinson's Disease. *Parkinsonism.Relat Disord.*: 15 Suppl 3: S209-S211; 2009
69. Hoglinger, G.U.; Rizk, P.; Muriel, M.P.; Duyckaerts, C.; Oertel, W.H.; Caille, I.; Hirsch, E.C.: Dopamine Depletion Impairs Precursor Cell Proliferation in Parkinson Disease. *Nat.Neurosci.*: 7(7): 726-735; 2004
70. Hughes, A.J.; Daniel, S.E.; Ben Shlomo, Y.; Lees, A.J.: The Accuracy of Diagnosis of Parkinsonian Syndromes in a Specialist Movement Disorder Service. *Brain*: 125(Pt 4): 861-870; 2002
71. Hunot, S.; Brugg, B.; Ricard, D.; Michel, P.P.; Muriel, M.P.; Ruberg, M.; Faucheux, B.A.; Agid, Y.; Hirsch, E.C.: Nuclear Translocation of NF-KappaB Is Increased in Dopaminergic Neurons of Patients With Parkinson Disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*: 94(14): 7531-7536; 1997
72. Huot, P.; Parent, A.: Dopaminergic Neurons Intrinsic to the Striatum. *J.Neurochem.*: 101(6): 1441-1447; 2007
73. Iancu, R.; Mohapel, P.; Brundin, P.; Paul, G.: Behavioral Characterization of a Unilateral 6-OHDA-Lesion Model of Parkinson's Disease in Mice. *Behav.Brain Res.*: 162(1): 1-10; 2005
74. Ichitani, Y.; Okamura, H.; Matsumoto, Y.; Nagatsu, I.; Ibata, Y.: Degeneration of the Nigral Dopamine Neurons After 6-Hydroxydopamine Injection into the Rat Striatum. *Brain Res.*: 549(2): 350-353; 1991
75. Ichitani, Y.; Okamura, H.; Nakahara, D.; Nagatsu, I.; Ibata, Y.: Biochemical and Immunocytochemical Changes Induced by Intrastriatal 6-Hydroxydopamine Injection in the Rat Nigrostriatal

- Dopamine Neuron System: Evidence for Cell Death in the Substantia Nigra. *Exp.Neurol.*: 130(2): 269-278; 1994
76. Iwata, S.; Nomoto, M.; Morioka, H.; Miyata, A.: Gene Expression Profiling in the Midbrain of Striatal 6-Hydroxydopamine-Injected Mice. *Synapse*: 51(4): 279-286; 2004
77. Jackson-Lewis, V.; Jakowec, M.; Burke, R.E.; Przedborski, S.: Time Course and Morphology of Dopaminergic Neuronal Death Caused by the Neurotoxin 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine. *Neurodegeneration.*: 4(3): 257-269; 1995
78. Jellinger, K.A.: Cell Death Mechanisms in Parkinson's Disease. *J.Neural Transm.*: 107(1): 1-29; 2000
79. Jenner, P.: Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *Ann.Neurol.*: 53 Suppl 3: S26-S36; 2003
80. Jenner, P.; Olanow, C.W.: The Pathogenesis of Cell Death in Parkinson's Disease. *Neurology*: 66(10 Suppl 4): S24-S36; 2006
81. Jenner, P.: Oxidative Stress and Parkinson's Disease. *Handb.Clin.Neurol.*: 83: 507-520; 2007
82. Jeon, B.S.; Jackson-Lewis, V.; Burke, R.E.: 6-Hydroxydopamine Lesion of the Rat Substantia Nigra: Time Course and Morphology of Cell Death . *Neurodegeneration.*: 4(2): 131-137; 1995
83. Kandel, E.; Schwartz, J.; Jessel, T.: Principles of Neural Science.
84. Kaur, H.; Halliwell, B.: Detection of Hydroxyl Radicals by Aromatic Hydroxylation. *Methods Enzymol.*: 233: 67-82; 1994
85. Kumar, R.; Agarwal, A.K.; Seth, P.K.: Free Radical-Generated Neurotoxicity of 6-Hydroxydopamine. *J.Neurochem.*: 64(4): 1703-1707; 1995

86. Lang, A.E.; Lozano, A.M.: Parkinson's Disease. Second of Two Parts. *N.Engl.J.Med.*: 339(16): 1130-1143; 1998
87. Langston, J.W.; Ballard, P.; Tetrud, J.W.; Irwin, I.: Chronic Parkinsonism in Humans Due to a Product of Meperidine-Analog Synthesis. *Science*: 219(4587): 979-980; 1983
88. Lee, C.S.; Sauer, H.; Bjorklund, A.: Dopaminergic Neuronal Degeneration and Motor Impairments Following Axon Terminal Lesion by Intrastratial 6-Hydroxydopamine in the Rat. *Neuroscience*: 72(3): 641-653; 1996
89. Lotharius, J.; Dugan, L.L.; O'Malley, K.L.: Distinct Mechanisms Underlie Neurotoxin-Mediated Cell Death in Cultured Dopaminergic Neurons. *J.Neurosci.*: 19(4): 1284-1293; 1999
90. Lundblad, M.; Picconi, B.; Lindgren, H.; Cenci, M.A.: A Model of L-DOPA-Induced Dyskinesia in 6-Hydroxydopamine Lesioned Mice: Relation to Motor and Cellular Parameters of Nigrostriatal Function. *Neurobiol.Dis.*: 16(1): 110-123; 2004
91. Maker, H.S.; Weiss, C.; Silides, D.J.; Cohen, G.: Coupling of Dopamine Oxidation (Monoamine Oxidase Activity) to Glutathione Oxidation Via the Generation of Hydrogen Peroxide in Rat Brain Homogenates. *J.Neurochem.*: 36(2): 589-593; 1981
92. Markey, S.P.; Johannessen, J.N.; Chiueh, C.C.; Burns, R.S.; Herkenham, M.A.: Intraneuronal Generation of a Pyridinium Metabolite May Cause Drug-Induced Parkinsonism. *Nature*: 311(5985): 464-467; 1984
93. McGeer, P.L.; Itagaki, S.; Boyes, B.E.; McGeer, E.G.: Reactive Microglia Are Positive for HLA-DR in the Substantia Nigra of Parkinson's and Alzheimer's Disease Brains. *Neurology*: 38(8): 1285-1291; 1988

94. McNaught, K.S.; Belizaire, R.; Isacson, O.; Jenner, P.; Olanow, C.W.: Altered Proteasomal Function in Sporadic Parkinson's Disease. *Exp.Neurol.*: 179(1): 38-46; 2003
95. Mitumoto, Y.; Watanabe, A.; Mori, A.; Koga, N.: Spontaneous Regeneration of Nigrostriatal Dopaminergic Neurons in MPTP-Treated C57BL/6 Mice. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*: 248(3): 660-663; 1998
96. Mizoguchi, K.; Yuzurihara, M.; Ishige, A.; Sasaki, H.; Tabira, T.: Chronic Stress Impairs Rotarod Performance in Rats: Implications for Depressive State. *Pharmacol.Biochem.Behav.*: 71(1-2): 79-84; 2002
97. Monville, C.; Torres, E.M.; Dunnett, S.B.: Comparison of Incremental and Accelerating Protocols of the Rotarod Test for the Assessment of Motor Deficits in the 6-OHDA Model. *J.Neurosci.Methods*: 158(2): 219-223; 2006
98. Moore, D.J.; West, A.B.; Dawson, V.L.; Dawson, T.M.: Molecular Pathophysiology of Parkinson's Disease. *Annu.Rev.Neurosci.*: 28: 57-87; 2005
99. Morimoto, S.; Kito, G.: [Rotarod Method in Young Rats and the Antidepressive Effect: Is the Rotarod Method Capable of Evaluating Antidepressive Effects?]. *Nippon Yakurigaku Zasshi*: 104(1): 39-49; 1994
100. Nishimura, F.; Yoshikawa, M.; Kanda, S.; Nonaka, M.; Yokota, H.; Shiroy, A.; Nakase, H.; Hirabayashi, H.; Oujy, Y.; Birumachi, J.; Ishizaka, S.; Sakaki, T.: Potential Use of Embryonic Stem Cells for the Treatment of Mouse Parkinsonian Models: Improved Behavior by Transplantation of in Vitro Differentiated Dopaminergic Neurons From Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*: 21(2): 171-180; 2003

101. Oertel, W.H.; Kupsch, A.: Pathogenesis and Animal Studies of Parkinson's Disease. *Curr.Opin.Neurol.Neurosurg.*: 6(3): 323-332; 1993
102. Olanow, C.W.; Tatton, W.G.: Etiology and Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Annu.Rev.Neurosci.*: 22: 123-144; 1999
103. Parkinson, J.: An Essay on the Shaking Palsy. 1817.
J.Neuropsychiatry Clin.Neurosci.: 14(2): 223-236; 2002
104. Paxinos, G.; Watson, C.: The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 1982
105. Piallat, B.; Benazzouz, A.; Benabid, A.L.: Subthalamic Nucleus Lesion in Rats Prevents Dopaminergic Nigral Neuron Degeneration After Striatal 6-OHDA Injection: Behavioural and Immunohistochemical Studies. *Eur.J.Neurosci.*: 8(7): 1408-1414; 1996
106. Przedborski, S.; Levivier, M.; Jiang, H.; Ferreira, M.; Jackson-Lewis, V.; Donaldson, D.; Togasaki, D.M.: Dose-Dependent Lesions of the Dopaminergic Nigrostriatal Pathway Induced by Intrastratial Injection of 6-Hydroxydopamine. *Neuroscience*: 67(3): 631-647; 1995
107. Radi, R.; Beckman, J.S.; Bush, K.M.; Freeman, B.A.: Peroxynitrite-Induced Membrane Lipid Peroxidation: the Cytotoxic Potential of Superoxide and Nitric Oxide. *Arch.Biochem.Biophys.*: 288(2): 481-487; 1991
108. Riederer, P.; Sofic, E.; Rausch, W.D.; Schmidt, B.; Reynolds, G.P.; Jellinger, K.; Youdim, M.B.: Transition Metals, Ferritin, Glutathione, and Ascorbic Acid in Parkinsonian Brains. *J.Neurochem.*: 52(2): 515-520; 1989

109. Rozas, G.; Labandeira Garcia, J.L.: Drug-Free Evaluation of Rat Models of Parkinsonism and Nigral Grafts Using a New Automated Rotarod Test. *Brain Res.*: 749(2): 188-199; 1997
110. Rozas, G.; Lopez-Martin, E.; Guerra, M.J.; Labandeira-Garcia, J.L.: The Overall Rod Performance Test in the MPTP-Treated-Mouse Model of Parkinsonism. *J.Neurosci.Methods*: 83(2): 165-175; 1998
111. Sauer, H.; Oertel, W.H.: Progressive Degeneration of Nigrostriatal Dopamine Neurons Following Intrastriatal Terminal Lesions With 6-Hydroxydopamine: a Combined Retrograde Tracing and Immunocytochemical Study in the Rat . *Neuroscience*: 59(2): 401-415; 1994
112. Schapira, A.H.; Cooper, J.M.; Dexter, D.; Clark, J.B.; Jenner, P.; Marsden, C.D.: Mitochondrial Complex I Deficiency in Parkinson's Disease. *J.Neurochem.*: 54(3): 823-827; 1990
113. Schmidt, N.; Ferger, B.: Neurochemical Findings in the MPTP Model of Parkinson's Disease. *J.Neural Transm.*: 108(11): 1263-1282; 2001
114. Schober, A.: Classic Toxin-Induced Animal Models of Parkinson's Disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res.*: 318(1): 215-224; 2004
115. Schwarting, R.K.; Bonatz, A.E.; Carey, R.J.; Huston, J.P.: Relationships Between Indices of Behavioral Asymmetries and Neurochemical Changes Following Mesencephalic 6-Hydroxydopamine Injections. *Brain Res.*: 554(1-2): 46-55; 1991
116. Schwarting, R.K.; Huston, J.P.: The Unilateral 6-Hydroxydopamine Lesion Model in Behavioral Brain Research. Analysis of Functional Deficits, Recovery and Treatments. *Prog.Neurobiol.*: 50(2-3): 275-331; 1996

117. Sedelis, M.; Hofele, K.; Auburger, G.W.; Morgan, S.; Huston, J.P.; Schwarting, R.K.: MPTP Susceptibility in the Mouse: Behavioral, Neurochemical, and Histological Analysis of Gender and Strain Differences. *Behav.Genet.*: 30(3): 171-182; 2000
118. Sedelis, M.; Schwarting, R.K.; Huston, J.P.: Behavioral Phenotyping of the MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. *Behav.Brain Res.*: 125(1-2): 109-125; 2001
119. Seitz, G.; Stegmann, H.B.; Jager, H.H.; Schlude, H.M.; Wolburg, H.; Roginsky, V.A.; Niethammer, D.; Bruchelt, G.: Neuroblastoma Cells Expressing the Noradrenaline Transporter Are Destroyed More Selectively by 6-Fluorodopamine Than by 6-Hydroxydopamine. *J.Neurochem.*: 75(2): 511-520; 2000
120. Sian, J.; Dexter, D.T.; Lees, A.J.; Daniel, S.; Jenner, P.; Marsden, C.D.: Glutathione-Related Enzymes in Brain in Parkinson's Disease. *Ann.Neurol.*: 36(3): 356-361; 1994
121. Silva, R.M.; Ries, V.; Oo, T.F.; Yarygina, O.; Jackson-Lewis, V.; Ryu, E.J.; Lu, P.D.; Marciniak, S.J.; Ron, D.; Przedborski, S.; Kholodilov, N.; Greene, L.A.; Burke, R.E.: CHOP/GADD153 Is a Mediator of Apoptotic Death in Substantia Nigra Dopamine Neurons in an in Vivo Neurotoxin Model of Parkinsonism. *J.Neurochem.*: 95(4): 974-986; 2005
122. Smeyne, M.; Jiao, Y.; Shepherd, K.R.; Smeyne, R.J.: Glia Cell Number Modulates Sensitivity to MPTP in Mice. *Glia*: 52(2): 144-152; 2005
123. Sofic, E.; Lange, K.W.; Jellinger, K.; Riederer, P.: Reduced and Oxidized Glutathione in the Substantia Nigra of Patients With Parkinson's Disease. *Neurosci.Lett.*: 142(2): 128-130; 1992

124. Sulzer, D.: Multiple Hit Hypotheses for Dopamine Neuron Loss in Parkinson's Disease. *Trends Neurosci.*: 30(5): 244-250; 2007
125. Sundstrom, E.; Stromberg, I.; Tsutsumi, T.; Olson, L.; Jonsson, G.: Studies on the Effect of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine (MPTP) on Central Catecholamine Neurons in C57BL/6 Mice. Comparison With Three Other Strains of Mice. *Brain Res.*: 405(1): 26-38; 1987
126. Sundstrom, E.; Fredriksson, A.; Archer, T.: Chronic Neurochemical and Behavioral Changes in MPTP-Lesioned C57BL/6 Mice: a Model for Parkinson's Disease. *Brain Res.*: 528(2): 181-188; 1990
127. Tanaka, K.; Ogawa, N.; Asanuma, M.: Molecular Basis of 6-Hydroxydopamine-Induced Caspase Activations Due to Increases in Oxidative Stress in the Mouse Striatum. *Neurosci.Lett.*: 410(2): 85-89; 2006
128. Tande, D.; Hoglinger, G.; Debeir, T.; Freundlieb, N.; Hirsch, E.C.; Francois, C.: New Striatal Dopamine Neurons in MPTP-Treated Macaques Result From a Phenotypic Shift and Not Neurogenesis. *Brain*: 129(Pt 5): 1194-1200; 2006
129. Tande, D.; Feger, J.; Hirsch, E.C.; Francois, C.: Parafascicular Nucleus Projection to the Extrastriatal Basal Ganglia in Monkeys. *Neuroreport*: 17(3): 277-280; 2006
130. Tanner, C.M.; Langston, J.W.: Do Environmental Toxins Cause Parkinson's Disease? A Critical Review. *Neurology*: 40(10 Suppl 3): suppl-30; 1990
131. Thoenen, H.; Tranzer, J.P.: Chemical Sympathectomy by Selective Destruction of Adrenergic Nerve Endings With 6-Hydroxydopamine. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Exp.Pathol.Pharmakol.*: 261(3): 271-288; 1968

132. Trepanier, G.; Furling, D.; Puymirat, J.; Mirault, M.E.:
Immunocytochemical Localization of Seleno-Glutathione
Peroxidase in the Adult Mouse Brain. *Neuroscience*: 75(1): 231-
243; 1996
133. Ungerstedt, U.: 6-Hydroxy-Dopamine Induced Degeneration of
Central Monoamine Neurons. *Eur.J.Pharmacol.*: 5(1): 107-110;
1968
134. Ungerstedt, U.: Striatal Dopamine Release After Amphetamine or
Nerve Degeneration Revealed by Rotational Behaviour. *Acta
Physiol Scand.Suppl*: 367: 49-68; 1971
135. Walkinshaw, G.; Waters, C.M.: Neurotoxin-Induced Cell Death in
Neuronal PC12 Cells Is Mediated by Induction of Apoptosis.
Neuroscience: 63(4): 975-987; 1994
136. Wallace, B.A.; Ashkan, K.; Heise, C.E.; Foote, K.D.; Torres, N.;
Mitrofanis, J.; Benabid, A.L.: Survival of Midbrain Dopaminergic
Cells After Lesion or Deep Brain Stimulation of the Subthalamic
Nucleus in MPTP-Treated Monkeys. *Brain*: 130(Pt 8): 2129-2145;
2007
137. Whishaw, I.Q.; Metz, G.A.; Kolb, B.; Pellis, S.M.: Accelerated
Nervous System Development Contributes to Behavioral Efficiency
in the Laboratory Mouse: a Behavioral Review and Theoretical
Proposal. *Dev.Psychobiol.*: 39(3): 151-170; 2001
138. Wu, Y.; Blum, D.; Nissou, M.F.; Benabid, A.L.; Verna, J.M.: Unlike
MPP+, Apoptosis Induced by 6-OHDA in PC12 Cells Is
Independent of Mitochondrial Inhibition. *Neurosci.Lett.*: 221(1): 69-
71; 1996
139. Yoritaka, A.; Hattori, N.; Uchida, K.; Tanaka, M.; Stadtman, E.R.;
Mizuno, Y.: Immunohistochemical Detection of 4-Hydroxynonenal

Protein Adducts in Parkinson Disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*: 93(7): 2696-2701; 1996

140. Yuan, H.; Sarre, S.; Ebinger, G.; Michotte, Y.: Histological, Behavioural and Neurochemical Evaluation of Medial Forebrain Bundle and Striatal 6-OHDA Lesions As Rat Models of Parkinson's Disease. *J.Neurosci.Methods*: 144(1): 35-45; 2005
141. Zigmond, M.J.; Abercrombie, E.D.; Berger, T.W.; Grace, A.A.; Stricker, E.M.: Compensations After Lesions of Central Dopaminergic Neurons: Some Clinical and Basic Implications. *Trends Neurosci.*: 13(7): 290-296; 1990
142. Zigmond, M.J.; Hastings, T.G.; Perez, R.G.: Increased Dopamine Turnover After Partial Loss of Dopaminergic Neurons: Compensation or Toxicity? *Parkinsonism.Relat Disord.*: 8(6): 389-393; 2002

Die Seiten 92-93 enthalten persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

Die Seiten 92-93 enthalten persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die nachfolgend genannten Professorinnen/Professoren und Dozentinnen/Dozenten:

Adamkiewicz, Arnold, Aumüller, Bach, Basler, Barth, Baum, Becker, Christiansen, Czubayko, Daut, Eilers, Feuser, Fritz, Fuhrmann, Gerdes, Geus, Gotzen, Griss, Gudermann, Hofmann, Jungclas, Kern, Klenk, Koolmann, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Lang, Latta, Maier, Maisch, Mandrek, Moll, Müller, Mutters, Oertel, Rehder, Remschidt, Renz, Richter, Röhm, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Seitz, Seyberth, Steiniger, Studer, Voigt, Weihe, Werner, Westermann, Wulf.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. Daniel Alvarez-Fischer für seine Hilfe bei der Durchführung dieser Arbeit danken. Vielen Dank für ein stetig offenes Ohr für Fragen und genauso offene Antworten, viel Geduld und konstruktive Kritik.

Ich möchte auch meinem Doktorvater PD Dr. Andreas Hartmann für die vertrauensvolle Annahme als Doktorandin und für die Möglichkeit diese Arbeit zu erstellen, danken.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Professor Dr. Oertel für die Bedingungen und Voraussetzungen, die diese Arbeit überhaupt ermöglicht haben.

Ich danke Matthias für seine geduldige und uneingeschränkte Unterstützung in allen Lebenslagen.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Charakterisierung des striatalen 6-OHDA-Tiermodells des Morbus Parkinson an der Maus“ im medizinischen Zentrum für Nervenheilkunde, Klinik für Neurologie, unter Leitung von PD Dr. Andreas Hartmann mit Unterstützung von Dr. Daniel Alvarez-Fischer ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischem Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde von mir in folgenden Publikationsorganen:

Experimental Neurology.: 210(1): 182-193; 2008, veröffentlicht.

Berlin, 04.Juni 2010